



**CLÁUDIA SOFIA
PÁSSARO BRAGADA**

**OPTIMIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE *PNEUMOCYSTIS*
JIROVECI POR CITOMETRIA DE FLUXO**



**CLÁUDIA SOFIA
PÁSSARO BRAGADA**

**OPTIMIZAÇÃO DA DETECÇÃO DE *PNEUMOCYSTIS*
JIROVECI POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica da Doutora Cidália Pina-Vaz, Professora associada com agregação da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Este trabalho foi realizado no Serviço de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Dedico este trabalho a 3 gerações: os meus pais, marido e filho

o júri

Presidente

Doutora Maria de Lurdes Gomes Pereira

Professora associada com agregação da Universidade de Aveiro

Doutora Cidália Irene Azevedo Pina-Vaz

Professora associada com agregação da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Doutor Acácio Agostinho Gonçalves Rodrigues

Professor associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso

Professora auxiliar da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A todos aqueles que me acompanharam e participaram na realização deste trabalho:

À Professora Doutora Cidália Pina-Vaz que foi o alicerce de todo este trabalho, pela sua incansável disponibilidade, empenho e grande incentivo. Obrigada por partilhar os seus conhecimentos e pelo tempo que me dedicou durante estes longos meses.

Ao Professor Doutor Acácio Rodrigues, Director do Serviço e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, agradeço a oportunidade e os meios necessários à realização deste trabalho.

À Sofia Costa Oliveira que foi a minha primeira guia nesta odisséia de protocolos citométricos. Pela sua orientação e simpatia.

À Joana Barbosa e Elisabete Ricardo pela sua paciência e estreita colaboração neste trabalho. Obrigada.

À Carla Campos e Ana Catarina Montes, as principais fornecedoras de amostras e sem as quais este trabalho não se teria realizado.

A todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina do Porto pelo caloroso acolhimento e simpatia que sempre demonstraram.

palavras-chave

Pneumocystis jirovecii, citometria de fluxo, pneumonia por *Pneumocystis*, imunodeprimidos

resumo

A pneumonia por *Pneumocystis* (PCP) em humanos é causada por um fungo actualmente denominado *Pneumocystis jirovecii*, anteriormente conhecido como *Pneumocystis carinii*. Trata-se da infecção pulmonar oportunista mais prevalente em doentes imunodeprimidos infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida, com patologias hematológicas de natureza oncológica, doenças inflamatórias, deficiências primárias da imunidade celular ou sob terapêuticas imunossupressoras (como transplantados de órgãos sólidos). A PCP permanece uma causa significativa de mortalidade e morbidade em casos de acesso limitado a cuidados de saúde ou a dispendiosos e específicos tratamentos anti-retrovirais ou quimioterápicos. Este trabalho teve como principal objectivo a optimização de um protocolo que permitisse detectar este agente pela tecnologia de citometria de fluxo, verificar a sua aplicabilidade em amostras clínicas comparativamente com a análise do esfregaço da amostra corada por imunofluorescência, e ainda avaliar a viabilidade destes microrganismos nas amostras. Após a optimização das condições experimentais, nomeadamente o tratamento das amostras com um agente mucolítico e filtração, determinação da concentração ideal de marcador fluorescente específico, protocolo de leitura e especificidade da marcação foram analisadas 420 amostras do tracto respiratório e estudada a viabilidade do *Pneumocystis jirovecii* nas mesmas. Todos os casos positivos na microscopia foram positivos por citometria; obtivemos contudo 8 resultados discrepantes, positivos por citometria mas negativos pela análise microscópica que responderam com sucesso à terapêutica dirigida. Quanto à viabilidade e porque as amostras se encontravam congeladas, todas se mostraram inviáveis. A citometria de fluxo mostrou ser uma excelente técnica para a detecção e avaliação da viabilidade do *Pneumocystis jirovecii*, pelo que a sua utilização na rotina laboratorial deve ser considerada.

keywords

Pneumocystis jirovecii, flow cytometry, *Pneumocystis pneumonia*, new method of diagnosis

abstract

Pneumocystis pneumonia (PCP) in humans is caused by a fungus designated *Pneumocystis jirovecii*, previous known as *Pneumocystis carinii*. It's the most prevalent lung oportunist infection in immune depressed patients with hematological cancer, human immunodeficiency virus infection, chronic inflammatory disease, cellular immunity primary deficiencies or in patients under immunosuppressant therapies. PCP remains a significant cause of mortality and morbidity in cases of limited access to health care or to expensive chemotherapy or antiretroviral treatment.

The purpose of the current investigation was to develop a protocol to detect *Pneumocystis jirovecii* by flow cytometry, to compare it with immunofluorescence technique used in routine and, evaluate the viability of this pathogen agent in clinical samples. After optimization of experimental conditions, namely processing clinical samples with a mucolytic agent and filtration, assesment of the ideal specific fluorescent marker concentration, adjustments of the reading protocol and testing the marker's specificity, 420 respiratory samples were analyzed and the viability of *Pneumocystis jirovecii* evaluated. All positive microscopy cases were positive by flow cytometry; eight results were positive on flow cytometry but negative on microscopic analyses, which we considered true positive cases, attending to clinical signs and therapeutic response. Concerning viability all microorganisms were unviable because they were frozen.

Flow cytometry is an excellent tool to detect and to evaluate the viability of *Pneumocystis jirovecii* and should be considered in daily routine practice.

ÍNDICE

Abreviaturas	3
1 - Introdução	5
1.1 - Importância do tema	5
1.2 – <i>Pneumocystis jirovecii</i>	5
1.2.1 – O agente e a sua história	5
1.2.2 – Taxonomia	8
1.2.3 - A diversidade no género <i>Pneumocystis</i>	10
1.2.4 - Ciclo de vida	11
1.2.5 – Modo de aquisição e transmissão	14
1.3 – Diagnóstico Laboratorial	15
1.3.1 – Amostras biológicas	16
1.3.2 – Detecção por microscopia	17
1.3.4 – Detecção por métodos de biologia molecular	18
1.4 - Citometria de fluxo	19
2 – Objectivos.....	22
3 - Material e Métodos	22
3.1 - Amostras, colheita e acondicionamento.....	22
3.2 – Análise por microscopia de epifluorescência	23
3.3 – Optimização do protocolo citométrico	24
3.3.1 – Processamento das amostras	24
3.3.2 – Optimização da concentração de marcador fluorescente específico	24
3.3.3 - Marcação com marcador fluorescente específico e iodeto de propídeo ..	24
3.3.4 - Leitura no citómetro de fluxo	24
3.4 – Estudo da especificidade da marcação.....	25
3.5 - Análise de amostras clínicas	25
3.6 - Análise estatística dos resultados obtidos	26
4 – Resultados.....	26
5 - Discussão.....	34
6 – Conclusões.....	37
7 - Limitações e perspectivas futuras	38
8 - Referências	39

ABREVIATURAS

BT - biópsia transbrônquica
CF - citometria de fluxo
DHFR - diidrofolato redutase
DHPS - diidropteroato sintetase
DNA - ácido desoxirribonucleico
EF3 - factor de alongamento 3
HAART - terapêutica anti-retrovírica de alta actividade
IF – imunofluorescência
IP - iodeto de propídeo
LB - lavado brônquico
LBA - lavado broncoalveolar
MSG - glicoproteína major de superfície
PCP – pneumonia por *Pneumocystis*
PCR - reacção em cadeia da polimerase
RNA – ácido ribonucleico
RT-PCR - reacção em cadeia da polimerase em tempo real
SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida
TS - timidilato sintetase
VIH - vírus da imunodeficiência adquirida

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - IMPORTÂNCIA DO TEMA

Apesar da diminuição na incidência de pneumonia por *Pneumocystis* (PCP), principalmente nos países desenvolvidos, e dos avanços na profilaxia e tratamento desta patologia é ainda preocupante o número de doentes em risco de a desenvolverem.

Doentes imunodeprimidos com patologias hematológicas de natureza oncológica, doenças inflamatórias, com deficiências primárias da imunidade celular ou sob terapêuticas imunossupressoras (como transplantados de órgãos sólidos) bem como doentes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), constituem o grupo de maior risco. A infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (VIH) mantém-se em crescendo nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, pelo que é expectável que os números relativos à pneumocistose sejam aí mais difíceis de controlar, ao que acresce um acesso a cuidados de saúde e ou a tratamentos anti-retrovirais ou quimioterápicos mais limitado. Por outro lado tem-se também verificado um aumento de multi-resistências nos doentes infectados com VIH expostos a todas as classes de anti-retrovirais com o consequente aumento de novas infecções oportunistas, sendo a mais prevalente a PCP.

Na literatura encontra-se igualmente documentado o desenvolvimento de resistências no contexto de profilaxia e tratamento “standard” em infecções por *Pneumocystis*.

Como esta patologia não se encontra erradicada e continua a ser responsável por um número significativo de pneumopatias, com taxas de mortalidade associadas não negligenciáveis, é importante continuar a investir no estudo e detecção do *Pneumocystis jirovecii*, procurando respostas laboratoriais rápidas e eficazes.

1.2 – *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*

1.2.1 – O AGENTE E A SUA HISTÓRIA

Durante estudos efectuados em amostras tecidulares de humanos infectados com a doença que mais tarde viria a ser conhecida como Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, Chagas (1909), usando um microscópio óptico, observou a presença de formas

císticas atípicas a nível pulmonar. O autor considerou que se tratavam de esquizontes tecidulares durante o ciclo de vida de uma nova espécie de tripanossomas, designada *Schizotrypanum cruzi*.

Em 1910 Antonio Carini observou a presença de um oocisto com características semelhantes quando analisava biópsias de pulmão de ratos infectados com *Trypanossoma lewisi* mas suspeitou que se tratasse de um organismo distinto, enviando algumas amostras ao seu colega Laveran para análise posterior (Souza *et al.* 2005).

Dois anos mais tarde Pierre e Marie Delanoe, alunos de Laveran, enquanto trabalhavam no Instituto Pasteur encontraram novamente estes oocistos mas, desta vez em ratos não infectados com tripanossomíase e consideraram-nos representativos de uma nova espécie de protozoário. Atribuíram-lhes então o nome de *Pneumocystis carinii* em honra do biólogo italiano Antonio Carini e atendendo ao seu tropismo para o pulmão, único órgão onde tinha sido isolado (Redhead *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2004).

Desde a sua descoberta até aos anos 40, o *P. carinii* foi considerado um microrganismo de pouca importância clínica. Apenas em 1942 foi “redescoberto” pelos investigadores holandeses van der Meer e Brug numa criança de 3 meses de idade e doença cardíaca congénita e documentaram a sua presença em 2 cadáveres de uma série de 104 autópsias (uma criança de 4 meses e um adulto de 21 anos). Provava-se assim e pela primeira vez a sua capacidade de infectar humanos.

O *P. carinii* foi inicialmente associado a um surto de pneumonia intersticial em orfanatos na Polónia durante a 2ª Guerra Mundial, e posteriormente no Irão onde se verificavam problemas de subnutrição e sobrelotação.

Em 1951, em Praga, o Dr. Josef Vanek apresentou um estudo em que o *P. carinii* foi apontado como o agente causal de pneumonia após a avaliação histológica de biópsias pulmonares de 16 crianças. No ano seguinte, Otto Jirovec verificou que algumas pneumonias intersticiais em recém-nascidos eram provocadas pelo mesmo agente. Até aos anos 80 o microrganismo adquiriu relevância crescente devido à descrição da PCP num número significativo de crianças e adultos submetidos a tratamentos imunossupressores de foro oncológico (1 a 25%) ou transplantes de órgãos (5 a 25%) e ainda em doentes com deficiências imunes congénitas (2 a 6%) (Morris *et al.* 2004). A partir deste período foi-lhe reconhecida especial importância clínica e actualmente é considerado o principal agente patogénico oportunista do pulmão, responsável por um número considerável de pneumonias fatais.

Com a pandemia de VIH-1 nos anos 80 a PCP emergiu como a doença mais frequentemente associada aos doentes com SIDA nos países industrializados, suplantando a incidência de infecções provocadas por *Mycobacterium avium*, *Candida albicans* ou *Cytomegalovirus*. A PCP apresentava-se como a manifestação inicial mais comum desta síndrome.

A pneumocistose pulmonar passou a constituir o principal factor de infecção e mortalidade entre a população portadora de VIH. Antes da introdução de profilaxia sistémica para a PCP em 1988, esta patologia atingia cerca de 60% dos doentes com VIH-1 e mais de 80% dos doentes com contagem de CD4 inferior a 200 células/cm³ (Kovacs *et al.* 2001). A utilização de quimioprofilaxia recorrendo à pentamidina, fármaco inicialmente utilizado para a tripanossomíase africana, a dapsona ou o trimetoprim/sulfametoxazol, permitiu diminuir significativamente o número de casos de pneumocistose. O uso de profilaxia para PCP aumentou para 16%, 43,7% e 55,4% em 1989, 1990 e 1991 respectivamente (Hoover *et al.* 1993). Esta medida revelou-se de tal forma eficaz que provocou um declínio da incidência de PCP, em doentes com VIH, para 53% em 1989, 49% em 1990, 46% em 1991 e 42% em 1992.

Durante os anos 90 esta tendência descendente manteve-se a uma razão de 3,4% por ano entre 1992 e 1995 (Palella *et al.* 1998, Kaplan *et al.* 2000).

Com a introdução da terapêutica anti-retrovírica de alta actividade (HAART) em 1996 verificou-se a quebra mais significativa na incidência de todas as infecções oportunistas em doentes com SIDA com uma diminuição drástica de pneumocistose de 21,5% por ano até 1998 (Figura 1) (Morris *et al.* 2004).

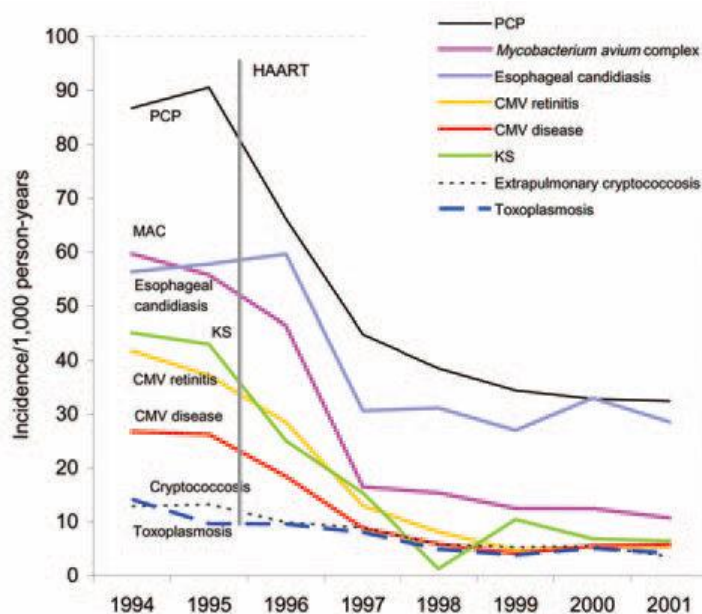


Figura 1. Taxa de infecções oportunistas por 1000 pessoas/ano.

Centers for Disease Control and Prevention: Adult and Adolescent Spectrum of Disease Project (1994–2001). CMV, *Cytomegalovirus*; HAART, terapêutica anti-retrovírica de alta actividade; KS, Sarcoma de Kaposi; MAC, Complexo *Mycobacterium avium*; PCP, Pneumonia por *Pneumocystis*. (Morris *et al.* 2004).

A diminuição do número relativo de pneumocistose em doente infectados com VIH verificou-se em todos os países desenvolvidos, como o Canadá (Forrest *et al.* 1998) ou em países da Europa Ocidental (Mocroft *et al.* 1998), reflectindo o diagnóstico precoce e o crescente acesso a tratamentos anti-retrovirais mais eficazes no controlo da SIDA. O grupo de estudos da EURO SIDA demonstrou que a incidência caiu de 4.9% em 1995 para 0,3% em 1998 (Weverling *et al.* 1999).

Devido à associação entre a PCP e a infecção por VIH observa-se um contraste dramático entre o cada vez menor número de casos presentes nos países industrializados e o franco aumento de incidência nos países em desenvolvimento, os quais continuam a ser devastados pelo VIH devido à pouca disponibilidade de profilaxia apropriada e de terapêuticas anti-retrovirais eficazes. A Organização Mundial de Saúde estima que no final de 2002 existiam 42 milhões de pessoas infectadas com VIH em todo o mundo, das quais 95% se encontravam em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. A maior incidência verifica-se no Sudeste asiático e na África subsaariana. Nesta última região estima-se que 55 milhões de pessoas faleçam de SIDA entre 2000 e 2020. A infecção por VIH está também a aumentar em áreas como a América Latina ou a Europa Oriental (Morris *et al.* 2004).

A PCP continua portanto a ser frequente em muitos destes países. Estudos realizados na Tailândia demonstram uma prevalência entre 27 e 40% em doentes infectados com VIH sob tratamento (Wannamethee *et al.* 1998). No Brasil um estudo determinou que 55% das pessoas infectadas com VIH e sintomas respiratórios foram mais tarde diagnosticados com pneumocistose (Weinberg *et al.* 1993).

Em crianças infectadas com VIH a PCP é também a infecção oportunista mais prevalente. A maior incidência dá-se no primeiro ano de vida, sendo o pico entre os 3 e 6 meses. A taxa de mortalidade é alta; antes da introdução da HAART e com base nos casos comunicados ao “Centers for Disease Control and Prevention”, 35% das crianças morriam no intervalo de 2 meses após o diagnóstico e o tempo médio de sobrevivência era de 19 meses. A mortalidade tem contudo vindo a diminuir, principalmente nos filhos de mães seropositivas. Quando é conhecida a infecção por VIH durante a gravidez ou logo após o parto está indicada a profilaxia para *P. jirovecii* a estes recém-nascidos (Mofenson *et al.* 2005).

1.2.2 – TAXONOMIA

A classificação taxonómica do *P. jirovecii* sofreu várias alterações desde a sua descoberta. Foi inicialmente classificado como protozoário com base na morfologia observável no hospedeiro e nas suas características fenotípicas, tais como a sensibilidade a determinados fármacos usados no tratamento de infecções causadas por protozoários – sulfonamidas e trimetoprim - e o facto de serem insensíveis aos antifúngicos – anfotericina B e cetoconazole - que têm como principal alvo a biossíntese de ergosterol, componente que não se encontra na membrana plasmática dos *P.*

jirovecii em concentrações significativas. As características morfológicas muito contribuíram para a sua classificação como protozoário pois apresenta uma forma trófica menor que a cística e o desenvolvimento de até oito corpos intracísticos com posterior ruptura, de forma a libertar as novas formas císticas (Stringer *et al.* 2002).

Embora alguns investigadores tenham descoberto semelhanças na ultra-estrutura do *P. jirovecii* com os fungos a sua classificação como protozoário foi válida até 1988 quando se procedeu à análise da subunidade menor do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) e à determinação do tamanho do seu genoma (Edman *et al.* 1988, Stringer *et al.* 1989).

Os resultados obtidos demonstraram que a sequência do gene codificador do 16S rRNA era mais semelhante à sequência de outros fungos do que a alguma das 12 sequências de protozoários disponíveis na altura. Apesar disso muitos investigadores expressaram algumas reservas em concluir que o *P. jirovecii* se tratasse de um fungo com base na sequenciação de um único gene quando comparado com um número tão limitado de protozoários. As dúvidas só se dissiparam em 1992 quando foram publicados vários estudos moleculares que permitiram estabelecer definitivamente uma ligação filogenética com o reino dos fungos (Stringer 1996).

Dados adicionais validaram esta nova taxonomia, como a presença de β -1,3 D-glucagon na parede celular e a consequente efectividade no uso de inibidores de glucagon contra os *Pneumocystis*; a existência de crista lamelar nas mitocôndrias; a presença de timidilato sintetase (TS) e dihidrofolato redutase (DHFR) como proteínas distintas (situação homóloga ao fungo *Saccharomyces cerevisiae* e oposta ao que se verifica nos protozoários em que apenas constituem uma única proteína) ou a reactividade dos seus anticorpos monoclonais contra uma grande variedade de fungos. O ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial que codifica o apocitocromo b, bem como a subunidade II da citocromo oxidase e subunidade menor mitocondrial do rRNA apresentam 60% de identidade com o DNA de outros fungos e apenas 20% com o DNA dos protozoários. Também a sequência do gene que codifica a subunidade maior mitocondrial do rRNA é muito próxima de alguns fungos (Shah *et al.* 1996). Outros genes do *P. jirovecii* foram úteis no estudo da sua taxonomia, incluindo a β e α -tubulina, a *TATA-binding protein*, a *P-type cation-translocation* ATPase ou vários genes do DNA mitocondrial, como o gene *actin* e o gene *arom* que codifica enzimas multifuncionais produtoras de aminoácidos aromáticos (Stringer 1996).

De todos os genes codificadores de proteínas isolados nos organismos *Pneumocystis*, o mais interessante é aquele que codifica o factor de alongamento 3 (EF3), até agora só encontrado em fungos. Durante a síntese de proteínas nos organismos eucariotas é necessária a presença dos factores de alongamento 1 e 2 mas nos fungos é indispensável um terceiro componente solúvel, o EF3. Esta proteína nos *Pneumocystis* apresenta 57% de homologia com a sequência do EF3 do *S. cerevisiae* e da *C. albicans* (Ypma-Wong *et al.* 1992).

A sua classificação como fungo é actualmente aceite pela comunidade científica apesar de o *P. jirovecii* apresentar particularidades que ainda levantam alguma controvérsia já que quando comparado com outros fungos patogénicos para o Homem apresenta várias características

atípicas. A mais importante e que dificulta o seu estudo é o facto de não crescer *in vitro*, desconhecendo-se ainda as causas para tal facto. Outra das suas características anómalas é o facto de não conter mais de duas cópias do gene codificador do 16S rRNA, enquanto a maioria dos fungos possui centenas de cópias deste gene. Em substituição do ergosterol contém abundante colesterol e pequenas quantidades de outros esteróis. Estes esteróis são presumivelmente produzidos pelo *P. jirovecii* uma vez que não são detectados em hospedeiros não infectados (Kaneshiro *et al.* 1994).

Devido a todas estas variações quer fenotípicas quer genéticas, não é de surpreender que até ao momento não tenha sido identificado qualquer parente próximo deste organismo. A classificação filogenética baseada na sequência do gene 16S rRNA sugere que o *P. jirovecii* represente uma linhagem divergente do reino dos fungos, coincidente com a bifurcação dos *Basidiomycetes* e *Ascomycetes*. A análise de outros genes (DHFR, TS, β -tubulina e actina) colocou os organismos *Pneumocystis* próximos aos *Ascomycetes*. Foi mesmo proposta a criação de uma nova família taxonómica, *Pneumocystidaceae*, e uma nova ordem, *Pneumocystidales*, na classe dos *Ascomycota* (Eriksson 1994).

De forma a estabelecer definitivamente uma classificação para estes microrganismos atípicos, em 2002 a *National Center of Biotechnology Information* propôs a sua inclusão no reino dos Fungos, filo *Ascomycotina*, sub-filo *Ascomycota*, classe *Pneumocystidomycetes*, ordem *Pneumocystidales* e família *Pneumocystidaceae*.

1.2.3 - A DIVERSIDADE NO GÉNERO *PNEUMOCYSTIS*

Os organismos *Pneumocystis* foram identificados em todas as espécies de mamíferos. Em humanos as pesquisas serológicas demonstraram uma seropositividade praticamente universal em populações testadas até aos dois anos de idade (Vargas *et al.* 2001).

Quando os microrganismos isolados provêm de hospedeiros diferentes estes apresentam características distintas tanto a nível fenotípico como genético.

As características fenotípicas que variam entre os *Pneumocystis* incluem (i) especificidade para cada hospedeiro (ii) antígenos (iii) mobilidade electroforética de enzimas e (iv) morfologia (Stringer 1996).

Como seria expectável pelas diferenças fenotípicas acima referidas, os *Pneumocystis* isolados são também geneticamente distintos. Esta heterogeneidade genética foi inicialmente observada na análise cromossómica por electroforese, onde se comprovou que o cariótipo dos organismos *Pneumocystis* presentes em ratazanas e humanos eram semelhantes mas distintos. Ambos os cariótipos possuem 15 bandas com tamanho compreendido entre 200 e 1.000 Kb, mas os padrões das bandas são diferentes.

Estudos posteriores, estabeleceram que os cariótipos em hospedeiros como o furão e o rato também eram diferentes e os seus genes não hibridizavam com nenhum dos 3 genes (DHFR, TS e β -tubulina) dos organismos *Pneumocystis* das ratazanas. Um resultado semelhante foi obtido

com o gene que codifica uma isoforma da glicoproteína major de superfície (MSG) ou glicoproteína de superfície A. Este gene encontra-se repetido cerca de 100 vezes no genoma de cada *Pneumocystis* e distribui-se pelos 15 cromossomas. De acordo com os resultados da sua sequenciação demonstrou-se que dependendo do hospedeiro, os organismos *Pneumocystis* apresentam diferenças em vários loci.

Após este reconhecimento, em 1994, foi determinada uma alteração do nome *P. carinii* f.sp *hominis* para infecções em humanos e *P. carinii* f.sp *carinii* para uma das duas espécies que infectam ratos.

Com o advento da utilização do método de reacção em cadeia da polimerase (PCR), designadamente por Wakefield que desenvolveu vários *primers*, foi possível amplificar o DNA de todas as espécies actualmente conhecidas de *Pneumocystis* (Wakefield 1998).

Novos estudos foram sendo desenvolvidos e aprofundados, tendo-se provado a partir de exames efectuados a 18 primatas de espécies diferentes que, as diferenças entre os genes que codificam a subunidade maior do rRNA e dihidropteroato sintetase (DHPS) dentro das espécies de *Pneumocystis* oscilavam entre 2 e 28% (Demanche *et al.* 2001).

Dos genes investigados a maior divergência é observada nas regiões do *internal transcribed spacer* do operão do rRNA, correspondendo a 40-50% de divergência (Helweg-Larsen 2004). É de salientar que estas variações são significativamente superiores às que se verificam entre outros fungos, como se depreende se considerarmos que entre *S. cerevisiae* e *S. rosei* a divergência é de 1% e entre *C. albicans* e *C. tropicalis* de 1,3%. Mesmo entre alguns fungos classificados como espécies diferentes a divergência não é tão acentuada (6,6% entre *S. cerevisiae* e *C. albicans*) (Stringer 1996).

Na sequência destas evoluções em 1999 Frenkel propôs que os organismos que causam infecção em humanos fossem renomeados *P. jirovecii* em honra do parasitologista checo Otto Jirovec (Gigliotti 2005, Stringer *et al.* 2002). Esta nova denominação foi-se consolidando na comunidade científica e em 2005 foi definitivamente acolhida no *International Code of Botanical Nomenclature*, distinguindo-se das demais designações para os *Pneumocystis* nos restantes hospedeiros (Cushion *et al.* 2005). Assim, *P. carinii* e *P. wakefield* referem-se a ratazanas, *P. murina* a ratos e *P. oryctolagi* a coelhos.

1.2.4 - CICLO DE VIDA

O maior obstáculo ao estudo do ciclo de vida resulta da incapacidade de cultivar o organismo *in vitro*, apesar de ter sido utilizada uma grande variedade de técnicas. Meios específicos para o crescimento de protozoários, bactérias e fungos e culturas de tecidos foram utilizados sem sucesso. Tentativas de simular o meio intra-alveolar provaram-se igualmente ineficazes. Também a impossibilidade de uso de modelos animais (já que a sua especificidade para cada hospedeiro apresenta diferenças genéticas consideráveis) e o facto de nunca ter sido detectado fora dos seus hospedeiros contribuem para os poucos conhecimentos existentes sobre

o ciclo de vida, reservatório primário, transmissão e epidemiologia do *P. jirovecii*. A escassa informação disponível resulta maioritariamente de estudos histoquímicos e a análise da sua ultra-estrutura foi efectuada em tecidos do pulmão, obtidos de roedores e alguns humanos infectados. O ciclo de vida actualmente aceite pela quase totalidade dos investigadores baseia-se em dados obtidos por microscopia electrónica de transmissão (Thomas *et al.* 2004).

O *P. jirovecii* apresenta tropismo para os pulmões, onde se encontra principalmente como patogénico alveolar, sem invadir o hospedeiro. Apenas em casos muito raros relacionados com uma imunodeficiência severa ocorre a sua disseminação. Nos pulmões podem ser identificadas por microscopia duas formas de *Pneumocystis*: cística (oocistos) e trófica (trofozoitos). Não só nestas duas formas mas em todas as fases do ciclo de vida do organismo verifica-se a presença de dupla membrana celular.

A forma cística apresenta uma parede celular densa e oval com aproximadamente 5 a 8 µm de diâmetro. Os oocistos maduros contêm até 8 corpos intracísticos fusiformes de 1,2 µm que após a sua libertação se transformam em trofozoitos.

As formas tróficas são menores, com 2 a 5 µm e parede muito fina. Os trofozoitos podem ser facilmente identificados devido à sua forma irregular e por estarem associados aos pneumócitos. Devido a este pleomorfismo a adesão entre os trofozoitos é irregular, formando agregados com muitas interdigitações, e por este motivo a identificação de células individuais nem sempre é possível. O citoplasma é pobre em organelos, predominando os ribossomas. Também são observadas estruturas tubulares e ramificadas semelhantes a retículos endoplasmáticos. O núcleo é excêntrico e o nucléolo tem localização central ou periférica.

Uma terceira forma, o pré-oocisto, é pouco frequente e representa um estadio intermédio (Souza *et al.* 2005).

O modo de replicação ainda não está completamente definido mas é proposto um ciclo de vida sexuado e assexuado (Figura 2). As formas tróficas [1] sofrem replicação assexuada por divisão binária [2-3] e na fase sexuada as formas tróficas haplóides sofrem conjugação [1] e produzem um zigoto ou pré-oocisto. O zigoto entra em meiose e subsequente mitose para produzir 8 núcleos haplóides (oocisto tardio) [3]. Os esporos exibem formas diferentes (esféricas ou alongadas). Postula-se que a elongação dos esporos precede a ruptura do oocisto. Após libertação dos esporos, a parede do cisto colapsa, mas retém algum citoplasma residual [4].

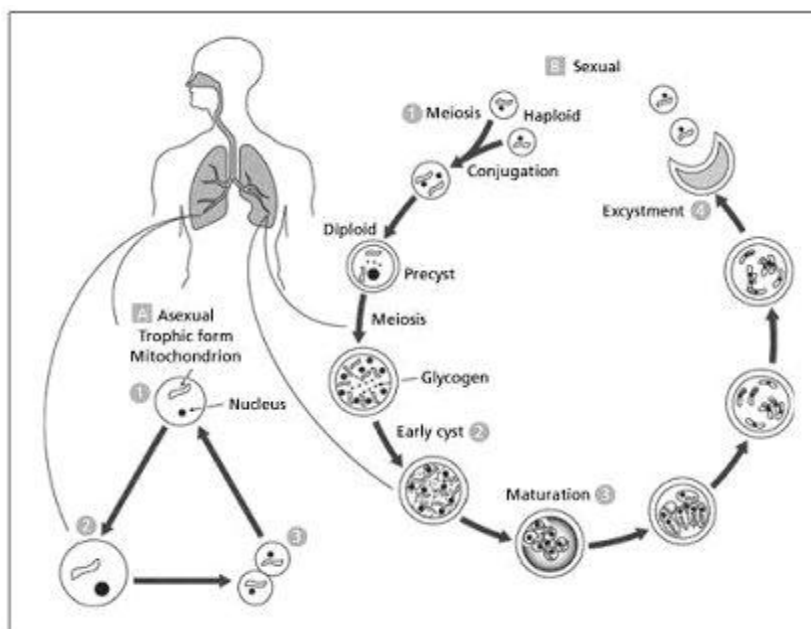


Figura 2 - Ciclo de vida do *Pneumocystis* (Wilson's Microbiology and Microbial Infections: 9th ed. New York: Arnold Publishing; 1998).

Após inalação, os *Pneumocystis* não entram nas células do hospedeiro, mas aderem às células alveolares de superfície tipo I. A infecção tem início com a ocupação dos espaços aéreos alveolares por um exsudado rico em trofozoítos, o que provoca um *shunt* arteriovenoso, ocorrendo o espessamento da membrana alveolar e a inflamação do parênquima, com consequente edema e fibrose. É então que se dá a replicação assexuada e a adesão às células alveolares de superfície tipo I. A aderência é mediada pela MSG a qual, estando presente na superfície da parede celular do microrganismo, é a responsável pela ligação específica que se estabelece com os macrófagos do hospedeiro (Pottratz *et al.* 1991).

A MSG tem entre 95 e 120 Kda e é o antígeno mais abundante na superfície dos *Pneumocystis*. Representa uma família de proteínas codificada por genes altamente polimórficos, distribuídos por todos os cromossomos deste organismo. O seu alto nível de variação antigénica altera a expressão de múltiplos genes, um sistema muito semelhante ao do *T. cruzi* cujo propósito não está definitivamente esclarecido mas que poderá servir para evasão à resposta imune do hospedeiro (Stringer *et al.* 2001).

Recentemente demonstrou-se que sistemas de quinases responsáveis pela regulação do ciclo de vida de outros fungos controlam também o ciclo de vida dos *Pneumocystis*. Estes organismos possuem as proteínas quinase *cdc2*, ciclina *cdc13* tipo-B e *cdc25* fosfatase (Thomas *et al.* 1998). A actividade da *cdc2* e *cdc13* é regulada de forma diferente ao longo do ciclo de vida e a quinase *cdc25* repara lesões no DNA em *checkpoints*.

A generalidade dos fungos utiliza a proteína quinase activadora da mitose para regular a resposta celular à reprodução, ao stress ambiental, à integridade da parede celular e ao

crescimento filamentosos ou de pseudolinfa. Moléculas homólogas às que regulam a integridade da parede celular e reprodução foram encontradas nos organismos *Pneumocystis*. O gene que codifica a proteína quinase activadora da mitose nos *Pneumocystis* opera no controlo de feromonas, e são os receptores das feromonas que permitem o início da replicação sexual das formas tróficas (Huang *et al.* 2006, Thomas *et al.* 2004, Vohra *et al.* 2004).

1.2.5 – MODO DE AQUISIÇÃO E TRANSMISSÃO

A já referida incapacidade de cultivar o *P. jirovecii* *in vitro*, além de dificultar o estudo da biologia do organismo, é também um obstáculo para descobrir o modo de aquisição (reactivação ou reinfeção) e transmissão, bem como o seu reservatório natural.

Durante muitos anos acreditou-se que esta patologia resultava da reactivação de uma infecção latente desde a infância. Estas conclusões baseavam-se principalmente em estudos serológicos já que a maioria das crianças desenvolve anticorpos anti-*Pneumocystis* durante a infância, ocorrendo a seroconversão antes dos 4 anos de idade (Lundgren *et al.* 1992). Evidências de *P. jirovecii* foram também encontradas em vítimas de Síndrome de Morte Súbita do Lactente. O DNA de *P. jirovecii* foi identificado em aspirados da nasofaringe obtidos durante episódios de infecções respiratórias ligeiras em 24 (32%) de 74 crianças. No mesmo estudo verificou-se que a seroconversão ocorria por volta dos 20 meses de idade em 67 (85%) das 79 crianças estudadas e que 14 crianças (18%) encontravam-se assintomáticas (Vargas *et al.* 2001).

Apesar destes resultados existem poucas evidências favorecendo a latência da infecção ao longo da vida. Através de técnicas de PCR, Wakefield não encontrou DNA de *P. jirovecii* em lavados broncoalveolares (LBA) de adultos saudáveis. O mesmo resultado foi corroborado por Peters em tecidos do pulmão de 15 adultos imunocompetentes quando das autópsias (Stringer *et al.* 2002). Estudos em animais também desacreditaram a hipótese da infecção latente, demonstrando que os organismos *Pneumocystis* são eliminados dos pulmões após o tratamento para PCP (Helweg-Larsen 2004). Apesar dos enormes avanços das técnicas de detecção molecular a presença de um único microrganismo é suficiente para conservar uma infecção latente pelo que se torna praticamente impossível provar a sua ausência em indivíduos saudáveis.

Em doentes com infecções recorrentes por *P. jirovecii* foi demonstrado que o microrganismo apresenta diferentes genótipos nos diversos episódios. Nestes doentes os distintos padrões alélicos estão relacionados com o local onde se efectuou o diagnóstico e não com o local de nascimento de cada doente. Estas observações foram interpretadas como reinfeções de diferentes *P. jirovecii* ao invés de uma infecção que vai tendo exacerbações ao longo da vida (Beard *et al.* 2000).

A possibilidade de reinfeção é também sugerida pelo aumento do número de mutações que provocam alterações nas sequências do gene DHPS, a enzima associada a resistências aos fármacos sulfa em muitos organismos incluindo protozoários como *Plasmodium falciparum* e bactérias como *Streptococcus pneumoniae*. Estas mutações não foram detectadas em doentes

que contraíram PCP antes do uso generalizado das sulfonamidas para tratar e prevenir a PCP mas é actualmente comum nos doentes, mesmo nos que não foram expostos a estes fármacos. As mesmas mutações relacionam-se também com a localização geográfica dos doentes com PCP, fundamentando a teoria da reinfecção (Stringer *et al.* 2002).

Quanto à forma de transmissão da pneumocistose é possível formular várias hipóteses. Apesar dos estudos em animais sugerirem que a transmissão ocorre por via aérea não se pode afastar a possibilidade de se efectuar a partir de fontes ambientais uma vez que o DNA de *P. jirovecii* já foi isolado em filtros de ar de hospitais e amostras de ar de meios rurais e urbanos (Huang *et al.* 2006).

A ideia de que a propagação se faz de indivíduo para indivíduo é corroborada pela existência de surtos epidémicos desde a 2ª Guerra Mundial, bem como pela existência de focos infecciosos em doentes imunodeprimidos hospitalizados. Assim, tem sido sustentado que o microrganismo tem como reservatório natural os pulmões dos mamíferos, transmitindo-se por via aérea, sobretudo durante os acessos de tosse do hospedeiro.

Recentemente têm sido descritos casos de doentes aparentemente imunocompetentes, com diferentes patologias pulmonares e sem quadro clínico compatível com PCP que através de técnicas moleculares se revelaram portadores assintomáticos de *P. jirovecii* com baixa carga parasitária (Matos *et al.* 2006). Pressupõe-se que a incidência da colonização por este microrganismo na população em geral seja maior do que se presume, com implicações importantes de saúde pública. Estes indivíduos e, principalmente, aqueles com doença pulmonar obstrutiva crónica, produzem expectoração e como tal, para além de poderem representar um reservatório deste microrganismo oportunista podem ser ainda uma fonte de fácil transmissão de *P. jirovecii* a imunocomprometidos, susceptíveis de adquirirem a pneumocistose (Morris *et al.* 2008). Vários investigadores têm demonstrado que a colonização/infecção assintomática por *P. jirovecii* dos pulmões de adultos saudáveis parece ocorrer essencialmente em pessoas com contacto ocupacional com seropositivos para VIH com PCP (Miller *et al.* 2001, Vargas *et al.* 2000). Miller e os seus colaboradores propuseram que a transmissão de *P. jirovecii*, provavelmente por via aérea pode desenrolar-se pelo menos de duas maneiras i) de imunocomprometidos infectados para outros imunocomprometidos susceptíveis e ii) de imunocomprometidos infectados para imunocompetentes com contacto estreito com os infectados (Miller *et al.* 2001).

1.3 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.3.1 – AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Como se trata de uma infecção quase exclusiva do pulmão e muito poucos microrganismos estão presentes no tracto respiratório superior, são necessárias amostras das vias do tracto inferior para um diagnóstico etiológico. As amostras biológicas podem ser colhidas de modo invasivo – por broncofibroscopia (lavados brônquicos (LB), LBA, escovados brônquicos), biópsia transbrônquica (BT) ou biópsia pulmonar com recurso a toracotomia – ou através de métodos não invasivos – expectoração.

A primeira escolha para o diagnóstico de PCP é a expectoração. Trata-se do produto biológico mais acessível, podendo obter-se de forma espontânea ou induzida. Devido ao baixo custo e à simplicidade da colheita, uma vez que não requer equipamento específico é o método de eleição em países com poucos recursos. A expectoração induzida, produzida pelos doentes após nebulização de uma solução hipertónica salina a 3%, apresenta uma sensibilidade superior quando comparada com a expectoração espontânea. A primeira tem uma sensibilidade entre 55% e 92% e especificidade de cerca de 98%. O método de detecção do agente também tem influência nestes resultados uma vez que as amostras tratadas por imunofluorescência apresentam valores de sensibilidade superiores aos corantes convencionais (67,1% *versus* 43,1%) (Cruciani *et al.* 2002). Estes valores dependem do facto de os doentes serem ou não portadores de VIH uma vez que doentes VIH positivo albergam um maior número de *Pneumocystis*. A obtenção de amostras de expectoração de qualidade é altamente dependente da execução da técnica e da capacidade do doente tolerar este procedimento. Em crianças com menos de 2 anos de idade verifica-se uma séria dificuldade na obtenção de expectoração devido ao pequeno tamanho das vias aéreas e à fraca capacidade de a produzir.

A profilaxia para PCP, especialmente pentamidina em aerossol diminui a sensibilidade das expectorações induzidas, encontrando-se demonstrado que em doentes sob esta profilaxia a sensibilidade é de 64% enquanto nos restantes doentes é de 92% (Levine *et al.* 1991). A sensibilidade da expectoração induzida é também menor após um episódio agudo de PCP (O'Donnell *et al.* 1998).

Quando não se consegue estabelecer o diagnóstico através da análise da expectoração deve-se realizar uma broncoscopia. Trata-se de um exame directo do interior dos canais brônquicos realizado com o auxílio do broncoscópio, que tem como objectivo efectuar uma colheita que pode ser um LBA ou LB. Estes dois tipos de amostras são obtidos pela mesma técnica, com recurso a lavagem com solução salina.

O LBA (por se realizar num nível inferior da árvore respiratória) possui uma sensibilidade superior à do LB para detecção de *P. jirovecii* e portanto é considerada a amostra de eleição para diagnóstico de PCP tanto em crianças como adultos. Nos doentes infectados com VIH a sensibilidade do LBA pode chegar aos 97-100%. Tal como se verifica na expectoração a

sensibilidade diminui (até 62%) nos doentes sob profilaxia com pentamidina em aerossol (Jules-Elysee *et al.* 1990).

A obtenção do LB e LBA pressupõe um método invasivo e como tal podem surgir complicações como hipóxia, hemoptises, pneumotórax ou aumento transitório dos infiltrados pulmonares no local da lavagem.

Os aspirados endotraqueais, recolhidos em doentes sob ventilação mecânica, têm também uma grande sensibilidade. Num estudo com 31 doentes foram apurados valores de sensibilidade de 92% de aspirados transbrônquicos (tendo como método de referência o LBA) tratados por imunofluorescência (Alvarez *et al.* 1997).

Como alternativa pode recorrer-se ao escovado brônquico. Esta técnica apresenta uma sensibilidade menor que as anteriores, especialmente quando comparada com o LBA, razão pela qual é pouco utilizada.

A biópsia transbrônquica (BT) apresenta uma elevada sensibilidade; contudo, devido à taxa considerável de complicações graves (cerca de 30% dos doentes desenvolvem pneumotórax) é raramente utilizada.

A biópsia pulmonar com recurso a toracotomia constitui a técnica de maior sensibilidade no diagnóstico da PCP. Apesar de permitir resultados conclusivos, é pouco utilizada pois trata-se de um procedimento invasivo que frequentemente exige a colocação de dreno torácico comportando um risco elevado para o doente. A sua indicação restringe-se a casos muito específicos e apenas quando o LBA e a BT são negativos.

1.3.2 – DETECÇÃO POR MICROSCOPIA

O diagnóstico de PCP requer a detecção do organismo em amostras do tracto respiratório, verificando-se na actualidade a utilização de várias técnicas, sendo a mais comum a microscopia. Existe uma variedade de corantes histológicos e citológicos convencionais que podem ser utilizados para detectar o *P. jirovecii*. Entre estes corantes podemos encontrar o nitrato de prata-metenamina de Gomori-Grocott, Papanicolaou, azul de toluidina-O, Wright-Giemsa, ácido periódico de Schiff e calcoflúor. Apesar da simplicidade da preparação das amostras estas técnicas encontram-se em desuso como método de diagnóstico uma vez que apenas coram uma das fases de desenvolvimento do microrganismo e portanto não permitem a visualização simultânea das formas trófica e cística. Por exemplo, o corante Wright-Giemsa decalca as formas tróficas enquanto o nitrato de prata-metenamina de Gomori-Grocott cora a parede dos oocistos. Outro inconveniente do uso dos corantes convencionais é a sua inespecificidade para os *Pneumocystis* pois também reagem com outros fungos e estruturas celulares, pelo que é obrigatório que se disponha de um observador bastante experiente.

Actualmente a imunofluorescência (IF) é a técnica mais comum utilizada no diagnóstico de PCP. O uso de anticorpos monoclonais específicos, marcados com fluorescência permite a detecção simultânea das formas trófica e cística. Comparativamente aos corantes anteriores a

sensibilidade e especificidade da IF é mais elevada, pelo que foi implementada como *gold standard* na pesquisa de pneumocistoses. Esta técnica tem como inconveniente a necessidade de equipamento específico (microscópio de fluorescência) bem como pessoal treinado na execução da técnica e observação das lâminas.

Todos os métodos de diagnóstico baseados na microscopia, com corantes convencionais ou IF, apresentam pouca sensibilidade, inexactidão na quantificação face a organismos agregados e ineficácia na distinção de organismos viáveis ou não viáveis (Thomas *et al.* 2004).

1.3.4 – DETECÇÃO POR MÉTODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

O diagnóstico por PCR foi introduzido experimentalmente em 1990 por Wakefield quando descreveu a primeira amplificação de DNA. A aplicação de variantes da PCR convencional tal como PCR em tempo real (RT-PCR) e *nested* PCR é actualmente alvo de investigação intensa para o diagnóstico de PCP (Fillaux *et al.* 2008, Limawongpranee *et al.* 2007).

Alguns estudos sobre o uso da PCR no diagnóstico de PCP apresentam valores de sensibilidade entre 81 e 100% e especificidade de 86 a 100% em expectoração e LBA (Olsson *et al.* 1993, Torres *et al.* 2000). Apesar de estes resultados parecerem promissores, o seu impacto clínico é pequeno já que os métodos microscópicos de diagnóstico, nomeadamente a IF, apresentam valores semelhantes e a um custo muito inferior.

Um dos primeiros problemas encontrados com a utilização destas metodologias foi a detecção de DNA de *P. jirovecii* em amostras de doentes com ausência de observações clínicas típicas de pneumonia. Inicialmente estes resultados foram tidos como falsos positivos mas a utilização de RT-PCR tem tentado resolver esta questão através da quantificação do DNA de modo a distinguir entre infecção e colonização. Estudos recentes sugerem que a contagem de organismos por RT-PCR é superior no caso de infecção quando comparado com colonização (Bandt *et al.* 2007). Assim, e porque ainda não se estabeleceram valores de *cutoff*, um resultado positivo deve ser sempre interpretado de acordo com os sintomas do doente e integrado com a pesquisa de outros patogénicos. Sabe-se também que 20% dos doentes encontram-se co-infectados (Benfield *et al.* 2001), e que a utilização exclusiva deste método não permite o diagnóstico destas situações. Assim, o diagnóstico não se deve basear exclusivamente nos resultados de PCR mas antes ser complementado com os métodos tradicionais. Com efeito a indicação para a utilização da técnica da PCR é como teste confirmatório em situações de ambiguidade nos resultados microscópicos.

A aplicação do *nested* PCR em lavados orais e gargarejos tem sido estudada como teste de rastreio uma vez que se trata de um método não invasivo. Mas esta técnica não apresenta qualquer vantagem pois a sua sensibilidade é de 44% e especificidade de 79% (Nyamande *et al.* 2005). Os lavados orais, pelo facto de serem recolhidos ao nível da cavidade oral, além de albergarem um número muito pequeno de microrganismos são constituídos por uma mistura de

secreções pulmonares com saliva. Por esta razão contêm substâncias inibidoras da amplificação do DNA, mais do que o LBA ou até do que a expectoração induzida (Matos *et al.* 2006).

Como acontece com outros métodos de diagnóstico é essencial que o uso das técnicas moleculares se encontre bem definido, tanto ao nível de protocolos utilizados como na atribuição de valores de referência para as diferentes populações. Por estas razões a comparação de resultados dos vários estudos já existentes é bastante difícil.

Mais do que a substituição de métodos convencionais por moleculares é a qualidade da colheita, o estadio da doença e a quantidade de amostra que determina a obtenção de melhores resultados no diagnóstico.

1.4 - CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo (CF) foi desenvolvida no final dos anos 50 para a contagem e análise de células sanguíneas. O seu desenvolvimento foi impulsionado inicialmente pelas áreas da hematologia e imunologia contudo, com a evolução técnica e o aparecimento de novos marcadores, a sua utilização generalizou-se a outras áreas.

A CF tem mostrado crescentes potencialidades em Microbiologia, contribuindo decisivamente para um conhecimento mais detalhado de certos fenómenos difíceis de serem estudados de outro modo como a detecção e contagem de microrganismos; estudo do crescimento, viabilidade, metabolismo e interacção com vários fármacos ou agentes físicos em culturas puras; e ainda na identificação e diferenciação de diversos organismos numa cultura mista.

Apresenta ainda a vantagem adicional da possibilidade de utilização directa no laboratório de apoio à clínica.

Um citómetro de fluxo é constituído por 5 elementos:

- Fonte(s) de radiação (lâmpada de mercúrio ou laser);
- Câmara de fluxo;
- Unidades de filtros ópticos para selecção de um intervalo de comprimento de onda específico a partir de uma gama espectral mais vasta;
- Fotodíodos ou fotomultiplicadores para a detecção sensível e processamento dos sinais com interesse;
- Unidade de processamento dos dados recolhidos.

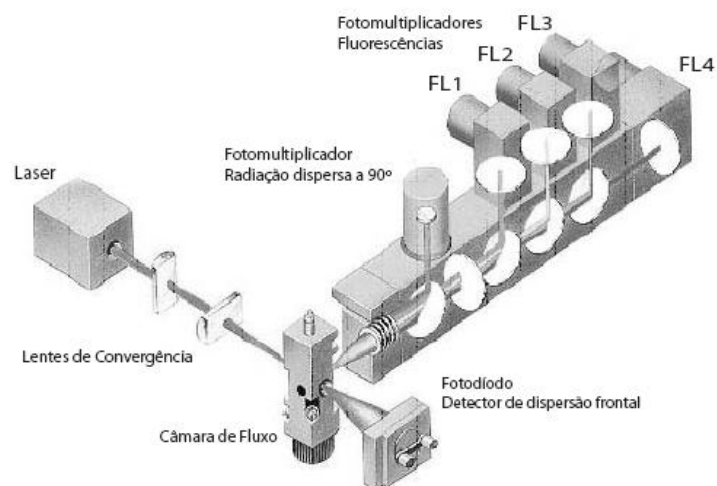


FIGURA 4 – Configuração de um citómetro de fluxo (BD Biosciences/ Enzifarma)

A suspensão celular é injectada atravessando a câmara célula a célula através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo. A passagem individual das células é obtida pela focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra, sendo esta injectada numa solução salina. A diferença de velocidades entre os dois meios faz com que o fluxo se processe em regime laminar. A velocidade de escoamento da solução salina é superior à da amostra, o que permite regular a espessura da solução da amostra de forma a permitir a passagem duma só célula de cada vez. Desta forma, podem detectar-se até 10.000 células (eventos) por segundo.

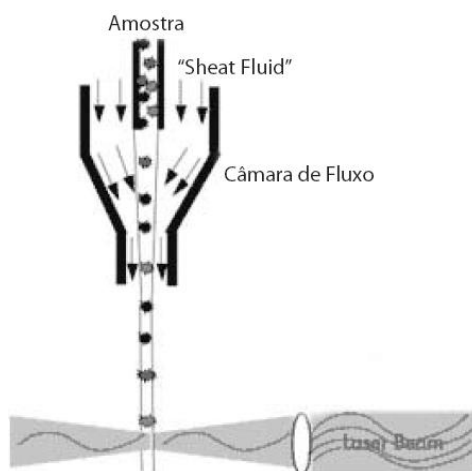


Figura 5 – Representação esquemática de uma câmara de fluxo. (Adaptação de slide disponível em Berkeley University/Flow Cytometry Facility)

O feixe de excitação ao interceptar a partícula (célula) na câmara, sofre uma dispersão quer na direcção frontal (forward scattering), quer lateral (side scattering). A radiação assim dispersa é detectada directamente por fotodíodos (dispersão frontal) ou pode ser desviada a 90° por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos e enviada para fotomultiplicadores. A combinação destes tipos de radiação dispersa revela informações importantes como a dimensão celular, a granularidade/complexidade e a morfologia. Compostos intracelulares com fluorescência intrínseca (clorofila, ficobiliproteínas, NAD(P)H, etc.) ou passíveis de se ligarem a diferentes corantes fluorescentes (fluorocromos), permitem a diferenciação selectiva de subpopulações.

Os citómetros actuais mais sofisticados possuem até 16 detectores em simultâneo, o que permite analisar múltiplas características celulares.

As principais vantagens da CF relativamente à microscopia tradicional são a velocidade e precisão permitindo o processamento de dezenas de amostras por dia e a análise de grandes populações celulares, bem como o facto de se tratar de um procedimento não destrutivo.

Uma vez que se baseia numa metodologia automatizada apresenta ainda a vantagem adicional de fornecer uma resposta em tempo útil, tão necessária mas ainda difícil na microbiologia médica, pelo que potencialmente se apresenta como um valioso método alternativo no diagnóstico da PCP.

Pese embora estejam disponíveis diversos protocolos de utilização em diferentes áreas da Microbiologia nomeadamente Micologia, Micobacteriologia e mesmo Parasitologia ainda não está acessível nenhum protocolo citométrico que contemple a detecção do *P. jirovecii*.

2 – OBJECTIVOS

Os objectivos deste trabalho consistiram em:

1. Optimizar as condições experimentais da citometria de fluxo para detectar *P. jirovecii* tais como:
 - Concentração ideal de marcador fluorescente específico
 - Protocolo de leitura
 - Especificidade da marcação
2. Avaliar a acuidade da citometria de fluxo em amostra clínicas, no diagnóstico da pneumonia por *P. jirovecii*, estudando comparativamente com a análise microscópica da amostra corada por imunofluorescência.
3. Avaliar a viabilidade do *P. jirovecii* pela incorporação de iodeto de propídeo (IP) simultaneamente com a marcação específica.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - AMOSTRAS, COLHEITA E ACONDICIONAMENTO

Para este estudo foram seleccionadas 420 amostras do tracto respiratório, das quais 380 eram LB e LBA e 40 aspirados de SB recebidas nos laboratórios de Microbiologia do Hospital de S. João no Porto, do Centro Hospitalar de Coimbra e do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil do Porto com suspeita de PCP. Para este último laboratório foram enviadas amostras provenientes do Hospital de Doenças Infecciosas Joaquim Urbano no Porto.

Foram recolhidos um máximo de 30 ml de LB ou LBA e 2 a 4 ml de SB, sendo colocados em recipientes esterilizados e congelados a -70°C para posterior análise por microscopia de epifluorescência e por CF.

3.2 – ANÁLISE POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA

O diagnóstico por microscopia foi realizado com recurso ao Detect IF™ Kit *Pneumocystis jirovecii* (Axis-Shield Diagnostics Limited, United Kingdom), um método de imunofluorescência qualitativo para detecção de oocistos de *P. jirovecii* em amostras humanas de LBA e SB. Baseia-se na identificação de *P. jirovecii*, pelos seus antígenos de superfície, utilizando um anticorpo monoclonal específico. A técnica foi executada com base nas instruções do fabricante, sendo os distintos passos preparados em câmara de fluxo laminar de nível II de segurança. Resumidamente as amostras foram tratadas, com o agente mucolítico N-acetil-L-cisteína (Merck®) durante 20 minutos a 37°C. Seguiu-se uma centrifugação durante 15 minutos a 3000g e de seguida as amostras foram lavadas com água destilada estéril duas vezes. Os sedimentos foram então ressuspendidos num pequeno volume de água destilada estéril e agitados em vórtex; 10 a 20 µl dessa amostra foram colocados numa lâmina de vidro (de microscopia de fluorescência) e deixadas evaporar até à desidratação. Por fim procedeu-se à fixação com acetona. As amostras foram cobertas com 20 µl da enzima diluída incluída no kit. Após 30 minutos em câmara húmida a 37 °C, as lâminas foram lavadas abundantemente em água destilada estéril e deixadas a secar ao ar. Seguidamente adicionaram-se 15 µl de anticorpo anti-*Pneumocystis jirovecii* e incubou-se durante 15 minutos a 37°C; procedeu-se a uma lavagem e reincubação com 15 µl de anticorpo anti-ratinho conjugado com FITC durante 15 minutos a 37°C. Após lavagem e secagem com papel absorvente foi colocada uma gota de meio de montagem e uma lamela sobre cada poço. A amostra foi observada em microscópio de epifluorescência Leitz Laborlux K (Leica, NY, U.S.A.) equipado com uma lâmpada de mercúrio de 50W, um filtro de excitação BP (“band pass”) de 450-490 nm e um filtro de emissão LP (“long pass”) de 515 nm com ampliação de 400 vezes. As amostras foram consideradas positivas perante a presença de oocistos de cor verde-maçã, com parede espessa, redondos ou ovais. Os microrganismos podem ser visualizados isoladamente e/ou em grupos.

3.3 – OPTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO CITOMÉTRICO

3.3.1 – PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a optimização do protocolo de análise citométrica foi utilizada uma mistura de quatro amostras clínicas de LB fortemente positivas e outra mistura de quatro amostras descritas como negativas por imunofluorescência. As amostras foram tratadas com o agente mucolítico N-acetil-L-cisteína (Merck®) em partes iguais durante 20 minutos em banho a 37°C. As amostras foram depois divididas em duas séries e uma das séries foi filtrada com filtros Partec CellTrics® de 30 µm de tamanho de poro.

Todas as amostras foram centrifugadas a 3000 g durante 5 minutos. A 100 µl do sedimento foram adicionados 20 µl de enzima diluída incluída no kit e incubou-se a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação procedeu-se a uma lavagem adicionando 500 µl de água destilada estéril e após homogeneização procedeu-se a nova centrifugação a 3000g durante 5 minutos, rejeitando-se o sobrenadante.

3.3.2 – OPTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MARCADOR FLUORESCENTE ESPECÍFICO

Com 100 µl do sedimento preparado anteriormente foram realizados ensaios utilizando 0, 5, 10, 15 e 20 µl de anticorpo monoclonal murino anti- *P. jirovecii*. As diferentes suspensões foram incubadas durante 15 minutos a 37°C. Adicionaram-se 500 µl de água destilada estéril e centrifugadas 5 minutos a 3000g. Ao precipitado adicionaram-se 0, 5, 10, 15 e 20 µl de anticorpo anti-rato conjugado com isocotianato de fluorescina (FITC). Incubaram a 37°C durante 15 minutos, protegidas da luz, seguindo-se uma centrifugação a 3000g durante 5 minutos e rejeição do sobrenadante. Por fim adicionaram-se 100 µl de água destilada estéril e as amostras foram colocadas em tubos apropriados para a sua leitura citométrica.

3.3.3 - MARCAÇÃO COM MARCADOR FLUORESCENTE ESPECÍFICO E IODETO DE PROPÍDEO

A 100 µl da mistura de amostras positivas marcadas com 10 µl de anticorpo anti- *P. jirovecii*, foram adicionados 20 µg/ml de iodeto de propídeo (IP) e incubou-se durante 15 minutos, à temperatura ambiente, protegido da luz, seguindo-se a leitura no citómetro de fluxo.

3.3.4 - LEITURA NO CITÓMETRO DE FLUXO

O estudo citométrico em cada ensaio incluiu a análise de uma amostra sem qualquer marcação (autofluorescência) e uma amostra positiva marcada com fluorocromo específico (FITC) de *P. jirovecii*.

O protocolo citométrico foi definido tendo em conta um histograma biparamétrico de dispersão de luz frontal (FS – *forward angle light scatter*) que define o tamanho das partículas *versus* a dispersão da luz lateral num ângulo de 90° (SS – *ortogonal angle light scatter*), que define a complexidade das partículas em análise, após definição de um “gate” (zona de análise onde se encontram as células a analisar) e a marcação efectuada.

As amostras foram analisadas numa escala logarítmica de quatro décadas em:

- 1) FL1: BP 530/30 nm (verde)
- 2) FL2: BP 585/42 nm (amarelo-esverdeado)
- 3) FL3: LP 650 nm (vermelho)

Quando efectuada uma dupla marcação com anticorpo específico e IP foi efectuado o registo da intensidade de fluorescência em FL1 *versus* FL3 e feita a análise da população celular seleccionada que emitia fluorescência em ambos os comprimentos de onda.

O citómetro de fluxo utilizado foi um FACSCalibur (BD Biosciences, Sydney) modelo “standard” equipado com 3 foto multiplicadores, um laser de árgon de 15 mW 488nm e “software Cell Quest Pro” (versão 4.0.2, BD Biosciences, Sydney, Australia). O controlo do equipamento obedeceu aos protocolos recomendados.

3.4 – ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DA MARCAÇÃO

Para estudar a especificidade da marcação, foram utilizadas amostras negativas para *P. jirovecii* por imunofluorescência. Adicionámos células de estirpes padrão de bactérias e leveduras pertencentes à *American Type Culture Collection*: *S. aureus* 25923, *E. coli* 35218 e *C. albicans* 10231. Suspensões celulares de cada estirpe foram preparadas em PBS estéril e a avaliação da concentração foi realizada por leitura óptica num fotómetro Densimat e ajustada com PBS estéril para uma turvação equivalente a 0,5 unidades MacFarland (aproximadamente 10^8 UFC/ml para *S. aureus* e *E. coli* e 10^6 UFC/ml para *C. albicans*). Cada uma destas suspensões foi adicionada isoladamente à amostra clínica a analisar de forma a obter uma concentração final de 10^5 microrganismos/ml. Seguiu-se então a marcação com anticorpo monoclonal específico nas condições previamente optimizadas e análise por citometria de fluxo.

3.5 - ANÁLISE DE AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras clínicas guardadas durante o período do nosso estudo pertencentes aos três laboratórios de Microbiologia acima citados foram processadas segundo o protocolo de análise microscópica de epifluorescência e de acordo com o protocolo otimizado para análise citométrica, que incluiu tratamento com agente mucolítico e filtragem já que isso se mostrou vantajoso. Os resultados foram analisados paralelamente por microscopia de epifluorescência e por citometria de fluxo, para análise comparativa.

3.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS

Foram consideradas amostras positivas para *P. jirovecii* as amostras que apresentaram 2 ou mais oocistos em todo o esfregaço na observação ao microscópio de epifluorescência. Na avaliação citométrica foi feita uma comparação em FL1 da autofluorescência da amostra com a fluorescência da amostra marcada com anticorpo específico. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram células no “gate” previamente definido com um aumento da fluorescência verde (FL1). Os resultados da análise das mesmas amostras por ambas as metodologias foram comparados.

Na ausência de um método padrão sensível e, na impossibilidade de obter uma avaliação por PCR, o diagnóstico de PCP torna-se difícil em certos casos. Nos casos discrepantes foram os critérios clínicos como dispneia com tensão de oxigénio < 70 mmHg, critérios radiológicos com raio-X característico (infiltrado intersticial difuso) e a resposta ao tratamento anti-*Pneumocystis* com resistência a outros antimicrobianos que foi utilizado como método padrão.

4 – RESULTADOS

Na figura 6 podemos observar uma imagem de microscopia de epifluorescência de uma amostra de LB positivo para oocistos de *P. jirovecii* corados por imunofluorescência indirecta. De notar que as células se encontram coradas de verde-maçã intenso.

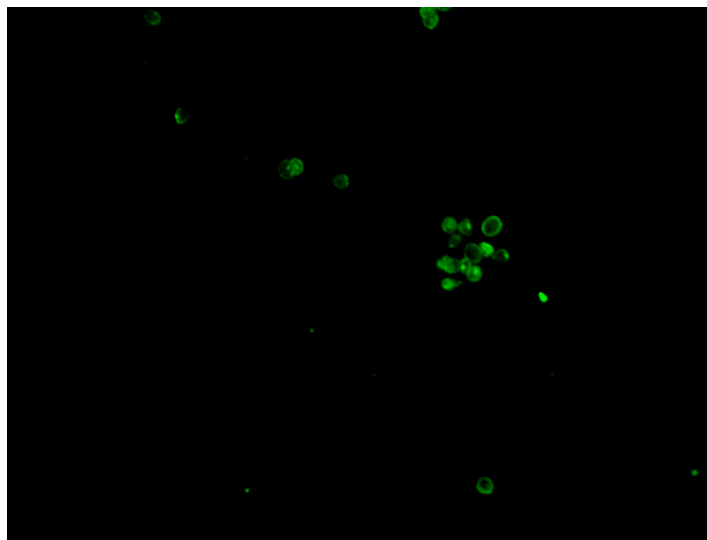


FIGURA 6 – Oocistos de *Pneumocystis jirovecii* em amostra de lavado brônquico, corados com anticorpo monoclonal específico e anticorpo anti-ratinho marcado com FITC. Fotografia de microscopia de epifluorescência (ampliação 400x)

Recorremos à mistura de várias amostras positivas para optimização do protocolo citométrico já que frequentemente estas apresentam baixos volumes e fracas positivities. Paralelamente, procedeu-se da mesma forma com as amostras negativas que serviram de controlo negativo da análise.

Para a análise citométrica há necessidade de tornar a amostra respiratória o mais fluida possível, pelo que foram todas tratadas com N-acetil-L-cisteína (mesmos as aparentemente fluidas) e calor (Figura 7). Resolvemos ainda assim avaliar a vantagem da filtração das amostras de forma a retirar restos celulares e outros elementos que pudessem dificultar a análise (Figura 8). Embora nas amostras estudadas sem filtração a positividade tivesse sido igualmente detectada, os resultados das amostras filtradas foram de mais fácil interpretação, com menor número de eventos, e uma marcação mais evidente. Assim, na análise posterior da maioria das amostras clínicas este processo foi utilizado.

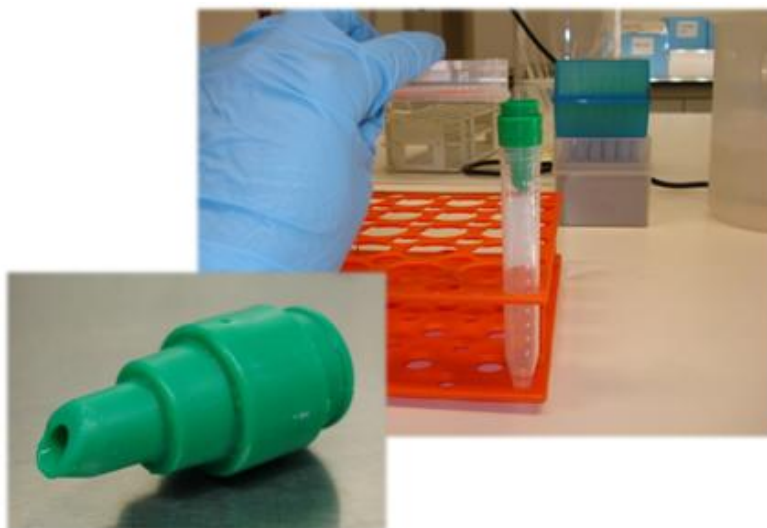


FIGURA 7 – Filtração das amostras respiratórias com filtros Partec CellTrics® de 30 µm.



FIGURA 8 – Amostra no banho a 37°C após tratamento com agente mucolítico N-acetil-L-cisteína.

Concentrações crescentes de anticorpo fluorescente específico aumentaram a marcação em FL1 (verde), sendo este aumento bem evidente quando passamos de 5 µl para 10 µl (Gráfico 1). Com 5 µl, a intensidade de fluorescência é muito baixa e próxima da autofluorescência (0 µl), enquanto que com 10 µl a marcação é elevada e próxima da intensidade de fluorescência obtida com 20 µl. Assim optamos pela concentração de 10 µl para posteriores análises.

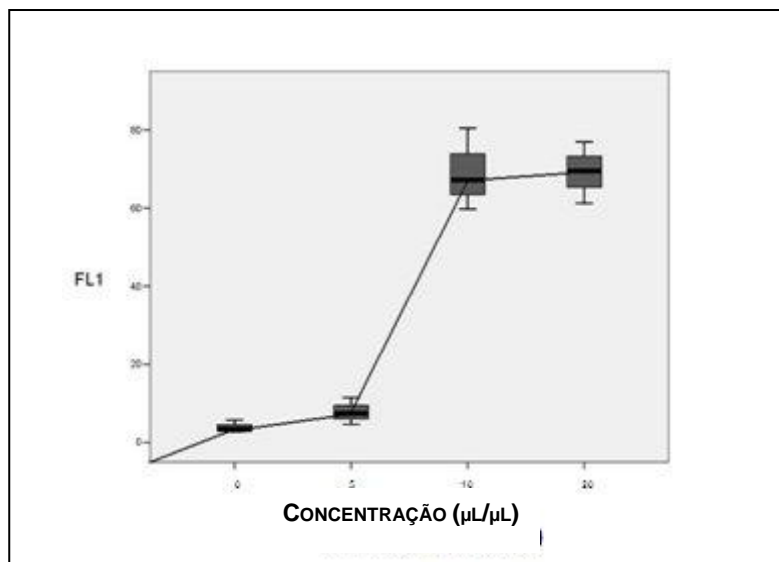
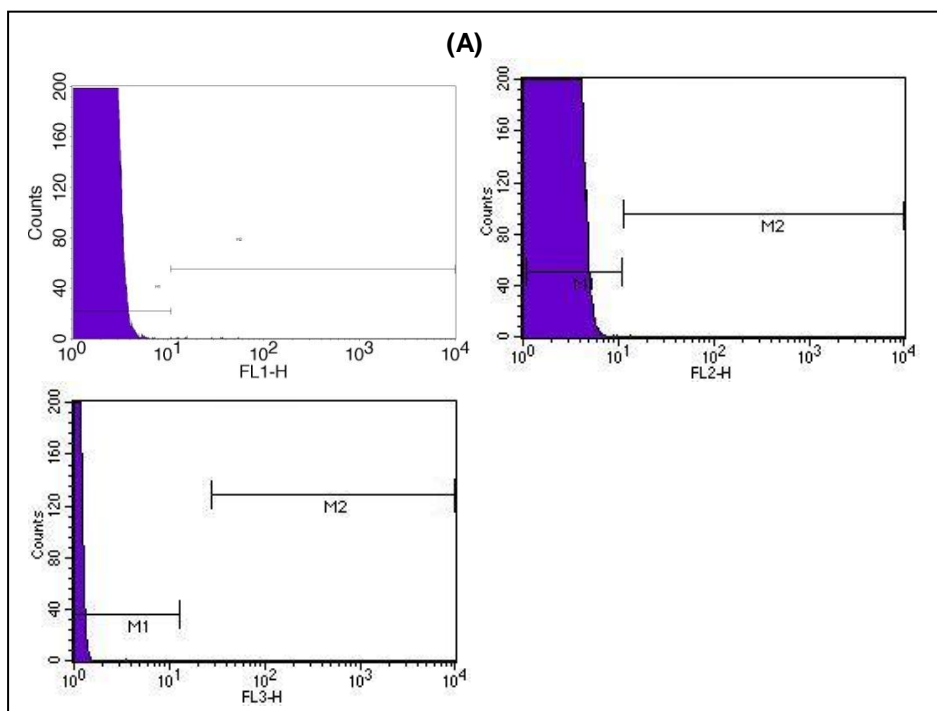


GRÁFICO 1 – Intensidade de fluorescência FL1 (530 nm) de uma amostra de lavado brônquico positiva para *Pneumocystis jirovecii*, após marcação com concentrações crescentes de anticorpo monoclonal específico e de anti-ratinho conjugado com FITC.

Várias representações citométricas podem ser efectuadas para a análise dos resultados. Na figura 9 podemos observar histogramas de dispersão celular e “density plots” nos diferentes comprimentos de onda, de um amostra positiva não marcada (A), amostra negativa (B) e amostra positiva marcada (C) para *P. jirovecii*. O aumento da intensidade de fluorescência é observado somente em FL1, pelo que é suficiente a análise neste comprimento de onda.



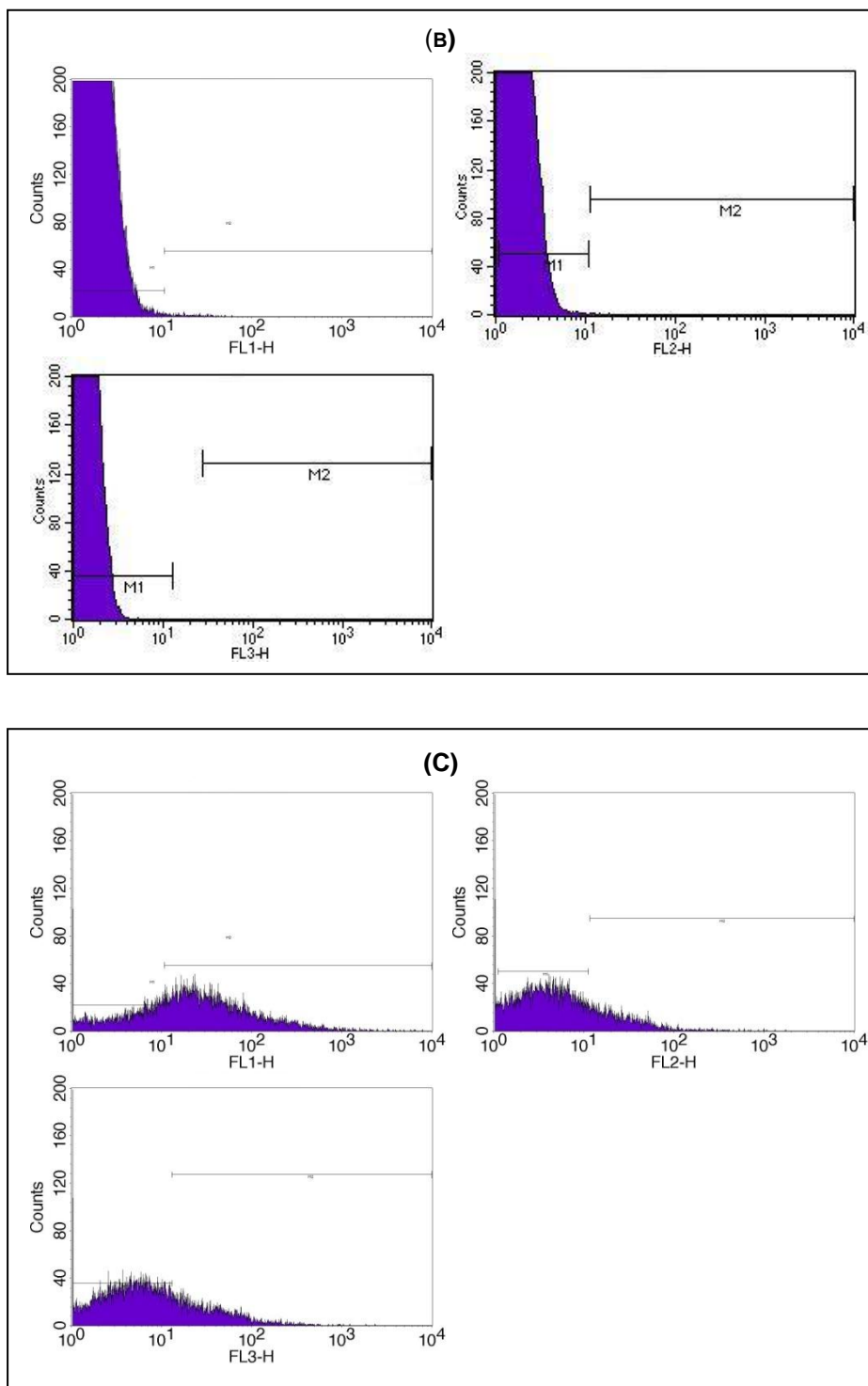


FIGURA 9 – Histogramas representativo da análise de uma amostra de lavado brônquico representando a intensidade de fluorescência das células em FL1 (530 nm), FL2 (585 nm) e em FL3 (650 nm). (A) representa a análise de uma amostra positiva para *Pneumocystis jirovecii* sem qualquer marcação (autofluorescência), em (B) uma amostra negativa e em (C) uma amostra positiva para *Pneumocystis jirovecii* ambas após marcação com anticorpo monoclonal específico e anticorpo anti-ratinho nas condições previamente estabelecidas.

Quanto à especificidade a marcação mostrou-se bastante específica já que mesmo inoculando as amostras com elevada concentração de outros microrganismos, a marcação foi nula

no caso dos cocos Gram negativos e muito escassa no caso dos bacilos Gram negativos e fungos (Figura 10).

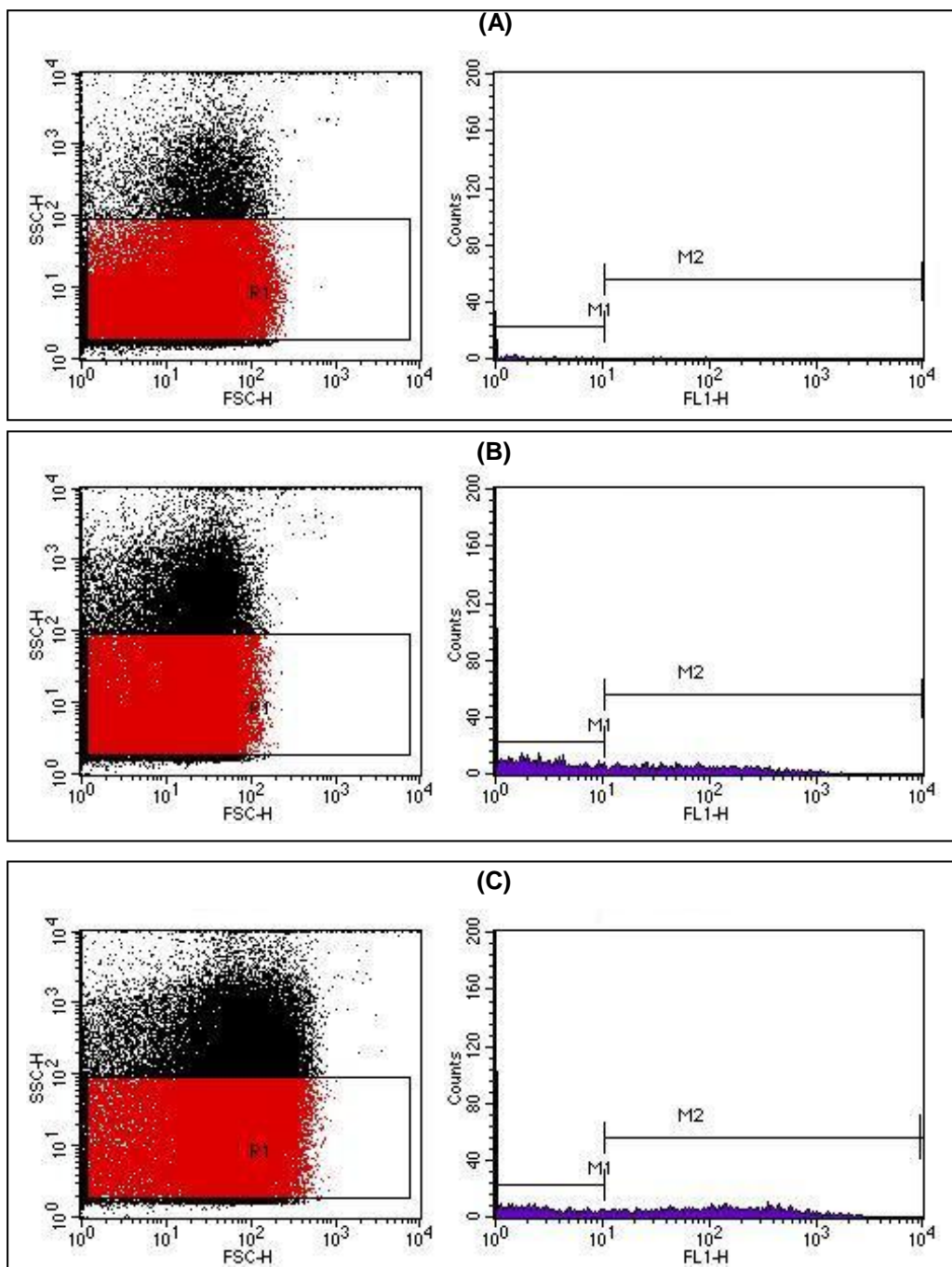


FIGURA 10 – “Scattergrams” (imagens da esquerda) e histogramas (imagens da direita) de uma amostra de lavado brônquico negativa para *P. jirovecii*, contaminada com diferentes microrganismos. (A) *Staphylococcus aureus*, (B) *Escherichia coli* e (C) *Candida albicans*.

A marcação com IP nas concentrações previamente descritas distingue claramente toda a população de *Pneumocystis* de verde (FL1) e vermelho (FL3). Como a coloração com IP não é

específica, corando os ácidos nucleicos de todas as células permeáveis, e já que a marcação específica de *P. jirovecii* é selectiva em FL1, é vantajosa a utilização da dupla marcação (Figura 11). No caso das nossas amostras clínicas como se encontravam congeladas e os microrganismos inviáveis obtivemos uma população de *Pneumocystis* com dupla marcação, verde e vermelha, traduzindo a presença de *P. jiroveci* inviáveis.

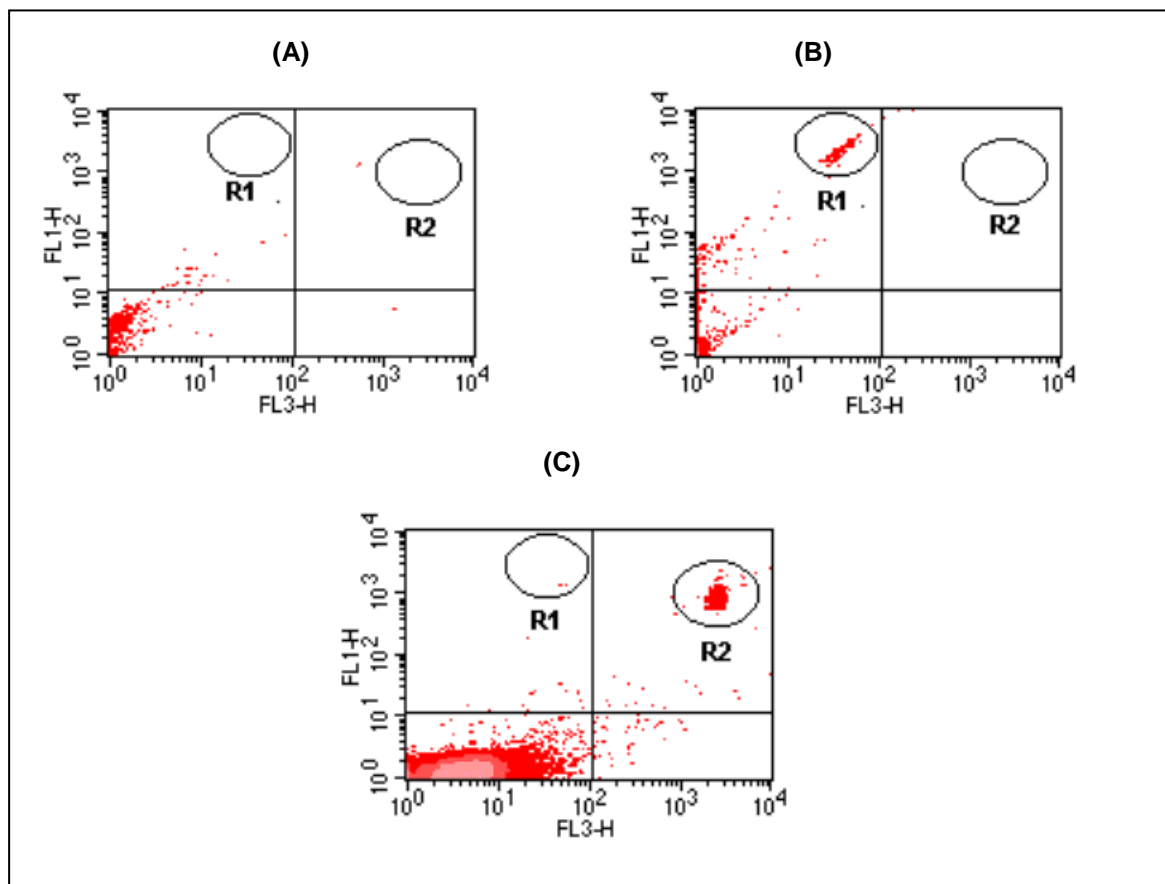


FIGURA 11- Representação da análise citométrica em dot-plot correlacionando a intensidade de fluorescência em FL1 (530 nm) com FL3 (625 nm) de uma amostra de lavado brônquico positiva para *Pneumocystis jiroveci*: A sem qualquer marcação (autofluorescência), B com anticorpo monoclonal específico e anticorpo anti-ratinho marcado com FITC e C com anticorpo monoclonal específico e anticorpo anti-ratinho marcado com FITC e iodeto de propídeo. R1 corresponde à zona ou “gate” com *P. jiroveci* marcados com anticorpo específico e R2 à zona de *P. jiroveci* com dupla marcação

Após este trabalho de optimização procedemos à análise de todas as amostras clínicas que nos foram disponibilizadas pelos diferentes laboratórios de Microbiologia. Na tabela 1 estão representados os resultados da análise de 420 amostras recorrendo a ambos os métodos, microscopia de epifluorescência e citometria. Todos os casos positivos, na microscopia foram positivos na citometria. Obtivemos contudo, 8 resultados discrepantes, positivos por citometria mas negativos pela análise microscópica. Da análise dos processos clínicos dos doentes dos casos

discrepantes pudemos constatar que todos tinham tido sinais clínico-radiológicos de PCP, tendo sido tratados com terapêutica dirigida, apesar do resultado laboratorial ser negativo (imunofluorescência), após o qual apresentaram claras melhorias. Assim, consideramos estes resultados citométricos como verdadeiros positivos, revelando-se assim um método mais sensível do que a imunofluorescência.

Importa salientar o facto da análise por citometria de fluxo ser efectuada com volumes de amostra bastante superiores (cerca de 100 µl) aos utilizados na microscopia (10 a 20 µl), o que por si só já aumenta a sensibilidade da análise.

AMOSTRAS NEGATIVAS		AMOSTRAS POSITIVAS	
IF	CF	IF	CF
340	332	80	88

TABELA 1 – Resultado das amostras clínicas de lavados brônquicos e secreções respiratórias colhidas por aspiração analisadas por microscopia de epifluorescência (IF) e por citometria de fluxo (CF) de acordo com protocolo previamente optimizado.

5 - DISCUSSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido um protocolo de análise de amostras respiratórias por CF, sendo posteriormente aplicado a um número elevado de amostras clínicas de doentes com suspeita de PCP pertencentes a quatro hospitais: S. João, IPO-Porto, Joaquim Urbano e Centro Hospitalar de Coimbra.

Os resultados foram comparados com a observação microscópica após coloração por IF indirecta, método utilizado na rotina hospitalar. Trata-se de uma técnica relativamente barata mas trabalhosa e que exige pessoal especializado na observação das preparações. Para as técnicas microscópicas estão descritas uma sensibilidade de cerca de 60% mas com elevada especificidade, 100% (Flori *et al.* 2004). Importa salientar que nesse caso o volume de amostra analisado é reduzido e a análise é muito dependente do observador.

A biologia molecular é, sem dúvida, uma metodologia promissora no diagnóstico da PCP mas que não estava disponível quando se iniciou este trabalho. Contudo as técnicas moleculares ainda apresentam falta de reprodutibilidade e de concordância interlaboratorial. O RT-PCR comparativamente ao PCR clássico, tem a vantagem adicional de ser quantitativo. Contudo a selecção de um *cut off* para a distinção entre colonização/ infecção ainda está por definir embora tenham já sido efectuadas várias tentativas (Linssen *et al.* 2006). Adicionalmente estão descritos alguns problemas técnicos relacionados com a inibição do PCR por agentes mucolíticos administrados quando da recolha das amostras (Flori *et al.* 2004). Uma grande limitação dos métodos moleculares é a impossibilidade de fornecerem informação sobre a viabilidade dos microrganismos. O diagnóstico de infecção pressupõe a presença de microrganismos viáveis, o que é distinto de uma pesquisa positiva por técnicas molecular.

Comparativamente às técnicas moleculares a CF é um método muito menos dispendioso e por se tratar de uma técnica automatizada é possível que um técnico com formação adequada a possa desempenhar sem dificuldade. A CF encontra-se claramente subexplorada em termos de Microbiologia uma vez que as suas aplicações podem ser muito vastas, quer em termos de investigação, quer de diagnóstico de apoio à clínica. Várias publicações têm apontado este método como muito valioso sobretudo na detecção de microrganismos cujo exame cultural é moroso como é o caso do *Mycobacterium* (Pina-Vaz *et al.* 2004) ou difícil como o *Cryptosporidium* (Barbosa *et al.* 2008a) ou *Giardia* (Barbosa *et al.* 2008b). Revolucionários são também os estudos de determinação da susceptibilidade a fármacos. A susceptibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* é possível por citometria após 72 horas versus 14 a 20 dias do método de referência (Pina-Vaz *et al.* 2005a). Relativamente a fungos foi possível a determinação da susceptibilidade ao fim de 1 hora versus 48 horas do método de referência (Pina-Vaz *et al.* 2001, Pina-Vaz *et al.* 2005b), sendo em alguns casos possível a determinação do mecanismo de acção de fármacos não classicamente conhecidos como antifúngicos (Pina-Vaz *et al.* 2000a, Pina-Vaz *et al.* 2000b)

bem como inferir alguns mecanismos de resistência a antifúngicos clássicos (Pina-Vaz *et al.* 2005c).

Neste trabalho optimizámos um método de diagnóstico de PCP baseado na análise por citometria de fluxo. Recorrendo aos anticorpos monoclonais específicos utilizados na microscopia de epifluorescência, desenvolvemos uma metodologia que se mostrou sensível e específica.

O primeiro estudo de citometria de fluxo para identificação do então designado *P. carinii* foi originalmente descrito por Libertin (Libertin *et al.* 1984) em homogeneizados do pulmão mas sem qualquer aplicação prática. Posteriormente outro estudo foi publicado com objectivos de quantificação e determinação da viabilidade deste microrganismo em culturas animais após acção de diversos fármacos (Lapinsky *et al.* 1991). A citometria tem a grande vantagem de ser uma análise quantitativa, mas relativamente a este agente apresenta dificuldades acrescidas já que é frequente a agregação dos microrganismos. Seria necessário obter grande número de microrganismos para efectuarmos diluições seriadas que possibilitassem uma padronização e estudos de reprodutibilidade. A quantificação teria interesse para distinguir casos de colonização *versus* infecção.

A dificuldade da citometria relativamente à análise de amostras clínicas começa pela definição do “gate” das partículas a analisar. A linguagem citométrica está cheia de anglicanismos com difícil tradução mas deve entender-se por “gate” como a zona pertencente à dispersão total das partículas (“scatter”) onde se encontram as células que queremos analisar. Esta selecção tem em conta as características morfológicas das células (tamanho e complexidade) mas, ao contrário da análise de culturas celulares puras, nas amostras clínicas existem muitas outras partículas que dificultam esta análise. Por isso as amostras para análise citométrica devem ser processadas de forma a recuperarmos ao máximo as células que queremos estudar e ao mínimo, as partículas que possam interferir. Por isso, preferimos o tratamento das amostras por filtração após prévia liquefacção. Apesar de ser um pouco mais trabalhoso a análise torna-se mais clara.

Definido o “gate” e utilizando anticorpos fluorescentes específicos vamos seguidamente pesquisar se há partículas pertencentes ao “gate” que sejam fluorescentes. Também aqui as amostras clínicas podem acarretar algumas dificuldades já que, podem estar presentes algumas células e ou microrganismos com autofluorescência. Apesar de não termos tido valores elevados de autofluorescências nas amostras analisadas parece-nos mais prudente que esta seja por sistema efectuada para cada amostra e que essa determinação, se elevada, seja subtraída à fluorescência da amostra marcada.

Aumentamos seguramente a sensibilidade da análise comparativamente à microscopia ao estudar um volume de amostra respiratória muito superior à que é analisada por microscopia. Aumentos de sensibilidade frequentemente acarretam diminuições da especificidade, e como o citómetro é um aparelho extremamente sensível, pode ocorrer o risco de detectar falsos positivos devido a imunofluorescência inespecífica. Reduzindo ao mínimo a concentração do marcador fluorescente e, lavando após a marcação, evitamos possíveis excessos de anticorpo fluorescente que poderia resultar em marcação inespecífica.

O desenvolvimento de um novo método encontra barreiras difíceis de transpor tal como a de nos certificarmos de que estamos a detectar verdadeiros positivos quando correspondem a resultados negativos no método tomado de referência. A pesquisa clínica que fizemos leva-nos a pensar que de facto eram verdadeiros positivos todos os casos discrepantes analisados por ambas as metodologias, já que os critérios clínico-radiológicos e a prova terapêutica assim o indicavam. A determinação por PCR nestes casos, poderia ter contribuído para o esclarecimento da dúvida mas tal não foi, na altura, possível.

A especificidade da análise citométrica relativamente a outros microrganismos foi demonstrada. As amostras respiratórias frequentemente apresentam uma população microbiana vasta e variada, o que nos levou a pôr a hipótese de, numa tecnologia tão sensível como a CF poder haver marcação inespecífica. De facto, apesar de terem sido contabilizados muito mais eventos isso não se traduziu num aumento do número de células fluorescentes no “gate” previamente definido.

A CF pode ainda fornecer informação sobre a viabilidade dos microrganismos, aspecto considerado crucial no diagnóstico de infecção. O IP é um dos clássicos marcadores de morte celular, tendo sido já utilizado por Lapinsky (Lapinsky *et al.* 1991). Uma vez que a marcação específica só emite no verde (FL1), foi possível a dupla marcação simultaneamente, o que poderá vir a ter grande utilidade. As nossas amostras já tinham sido congeladas e todos os ensaios que efectuamos em amostras positivas mostraram que os microrganismos estavam inviáveis. A análise somente com IP não tem interesse, já que é inespecífica pois o marcador liga-se aos ácidos nucleicos de diversas células com lesão de membrana. Esta abordagem, aplicada em amostras colhidas recentemente pode mostrar microrganismos viáveis na totalidade ou em parte, podendo ajudar no diagnóstico de infecção activa e até no seguimento da terapêutica, em casos específicos.

6 – CONCLUSÕES

Neste trabalho desenvolvemos uma metodologia de análise citométrica para a pesquisa de *P. jirovecii* em amostras respiratórias que mostrou maior sensibilidade do que a análise por microscopia de epifluorescência. Demonstramos ainda a sua especificidade, não havendo reacções cruzadas com *S. aureus*, *E. coli* ou *C. albicans*.

Descrevemos ainda uma marcação dupla que, poderá vir a ter relevância clínica, já que acrescenta informação adicional sobre a viabilidade dos microrganismos em amostras clínicas.

7 - LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A grande limitação deste trabalho foi a falta de microrganismos em abundância. A não existência no mercado de uma estirpe padrão como acontece relativamente à maioria dos microrganismos não permitiu a realização de estudos tais como a análise quantitativa e determinação da sensibilidade da técnica. Só com a possibilidade de analisar suspensões de concentrações conhecidas e seriadas este trabalho será possível.

De interesse futuro será a comparação entre o método citométrico com as técnicas moleculares, neste momento já disponível entre nós.

8 - REFERÊNCIAS

Alvarez F, Bandi V, Strager C, Guntupalli KK. Detection of *Pneumocystis carinii* in tracheal aspirates of intubated patients using calcofluor-white (Fungi-Fluor) and immunofluorescence antibody (Genetic Systems) stains. Crit Care Med. 1997; 25(6):948-52.

Bandt D, Monecke S. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jiroveci*. Transpl Infect Dis. 2007; 9(3):196-202.

[Barbosa JM](#), [Costa-de-Oliveira S](#), [Rodrigues AG](#), [Hanscheid T](#), [Shapiro H](#), [Pina-Vaz C](#). A flow cytometric protocol for detection of *Cryptosporidium* spp. Cytometry A. 2008a;73(1):44-7.

Barbosa J, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. [Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of *Giardia lamblia*](#). Travel Med Infect Dis. 2008b;6(4):234-9.

[Beard CB](#), [Carter JL](#), [Keely SP](#), [Huang L](#), [Pieniazek NJ](#), [Moura IN](#), [Roberts JM](#), [Hightower AW](#), [Bens MS](#), [Freeman AR](#), [Lee S](#), [Stringer JR](#), [Duchin JS](#), [del Rio C](#), [Rimland D](#), [Baughman RP](#), [Levy DA](#), [Dietz VJ](#), [Simon P](#), [Navin TR](#). Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. Emerg Infect Dis. 2000; 6(3):265-72.

Benfield TL, Helweg-Larsen J, Bang D, Jurge J, Lundgren JD. Prognostic markers of short-term mortality in AIDS-associated *Pneumocystis carinii* pneumonia. Chest. 2001; 19(3):844-51.

Cruciani M, Marcati P, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in VIH-1 infected patients. Eur Respir J. 2002; 20(4):982-9.

Cushion MT, Stringer JR. Has the name really been changed? It has for most researchers. Clin Infect Dis. 2005; 41(12):1756-8.

Demanche C, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakerfield AE, Dei-Cas E, Guillot J. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* in 18 Primate Species Confirms Host Specificity and Suggests Coevolution. J Clin Microbiol. 2001; 39(6): 2126-33.

Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature. 1988; 334(6182):519-22.

Eriksson OE. *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (*Pneumocystidaceae*, *Pneumocystidales*, *Ascomycota*). Syst Ascomycetum. 1994; 13:165-80.

Fillaux J, Malvy S, Alvarez M, Fabre R, Cassaing S, Marchou B, Linas MD, Berry ^a Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. J Microbiol Methods. 2008;75(2):258-61.

[Flori P](#), [Bellele B](#), [Durand F](#), [Raberin H](#), [Cazorla C](#), [Hafid J](#), [Lucht F](#), [Sung RT](#). Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. [J Med Microbiol](#). 2004;53(7):603-7.

Forrest DM, Seminari E, Hogg RS, [Yip B](#), [Raboud J](#), Lawson L, [Phillips P](#), [Schechter MT](#), [O'Shaughnessy MV](#), [Montaner JS](#). The incidence and spectrum of AIDS-defining illnesses in persons treated with antiretroviral drugs. Clin Infect Dis. 1998; 27(6):1379-85.

Gigliotti F. *Pneumocystis carinii*: has the name really been changed? Clin Infect Dis. 2005; 41(12):1752-5.

Helweg-Larsen J. *Pneumocystis jirovecii*. *Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis*. Dan Med Bull. 2004; 51(3):251-73.

Hoover DR, Saah AJ, Bacellar H, Phair J, Detels R, Anderson R, Kaslow RA. Clinical manifestations of AIDS in the era of *Pneumocystis* prophylaxis Multicenter AIDS Cohort Study. N Engl J Med. 1993; 329(26):1922-6.

Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM. ATS *Pneumocystis* Workshop Participants. An official ATS workshop summary: recent advances and future directions in *Pneumocystis* pneumonia (PCP). Proc Am Thorac Soc. 2006; 3(8):655-64.

Jules-Elysee KM, Stover DE, Zaman MB, Bernard EM, White DA. Aerosolized pentamidine: Effect on diagnosis and presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Ann Intern Med. 1990; 112(10):750-7.

Kaneshiro ES, Ellis JE, Jayasimhulu K, Beach DH. Evidence of the presence of "metabolic sterols" in *Pneumocystis*: identification and initial characterization of *Pneumocystis carinii* sterols. J Eukaryot Microbiol. 1994; 41(1):78-85.

Kaplan JE, Hanson DL, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, Lindegren ML, Holmberg S, Jones JL. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. Clin Infect Dis. 2000; 30 Suppl 1:S5-14.

Kovacs JA, Gill VJ, Meshnick S, Masur H. New insight into transmission, diagnosis and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. JAMA. 2001; 286(19):2450-60.

Kulke MH, Vance EA. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients receiving chemotherapy for breast cancer. Clin Infect Dis. 1997; 25(2):215-8.

Lapinsky SE, Glencross D, Car NG, Kallenbach JM, Zwi S. Quantification and assessment of viability of *Pneumocystis carinii* organisms by flow cytometry. J Clin Microbiol. 1991;29(5):911-5.

[Levine SJ](#), [Masur H](#), [Gill VJ](#), [Feuerstein I](#), [Suffredini AF](#), [Brown D](#), [Lane HC](#), [Yarchoan R](#), [Shelhamer JH](#), [Ognibene FP](#). Effect of aerosolized pentamidine prophylaxis on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by induced sputum examination in patients infected with the human immunodeficiency virus. Am Rev Respir Dis. 1991; 144(4):760-4.

Libertin CR, Woloschak GE, Wilson WR, Smith TF. Analysis of *Pneumocystis carinii* cysts with a fluorescent –activated cell sorter. J Clin Microbiol. 1984;20(5):877-80.

Limawongpranee S, Wanachiwanawin D, Chokephaibulkit K, Onchrotchanakun J, Lertlaituan P, Wankhom S. Sensitive detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in gastric wash using nested polymerase chain reaction. Southeast Asian J Trop Med Health. 2007;38(5):892-6.

Linssen CF, Jacobs JA, Beckers P, Templeton KE, Bakkers J, Kuijper EJ, Melchers WJ, Drent M, Vink C. [Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage fluid samples.](#) J Med Microbiol. 2006;55(9):1229-35.

Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen T, Mathiesen L, Nielsen JO, Kovacs JA. Antibody responses to a major *Pneumocystis carinii* antigen in human immunodeficiency virus – infected patients with and without *P. carinii* pneumonia. J Infect Dis. 1992; 165(6):1151-5.

Matos O, Costa MC, Correia I, Monteiro P, Vieira J, Soares J, Bonnet M, Esteves F, Antunes F. Infecção por *Pneumocystis jirovecii* em imunocompetentes com patologia pulmonar em Portugal. Acta Med Port. 2006; 19(2):121-6.

Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. J Clin Microbiol. 2001; 39(11):3877-82.

Mocroft A, Vella S, Benfield TL, [Chiesi A](#), [Miller V](#), [Gargalianos P](#), [d'Arminio Monforte A](#), [Yust I](#), [Bruun JN](#), [Phillips AN](#), [Lundgren JD](#). Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. Euro SIDA Study Group. Lancet. 1998; 352(9142):1725-30.

Mofenson LM, Oleske J, Serchuck L, Dyke RV, Wilfert C. Treating opportunistic infections among HIV-exposed and infected children: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2005; 40 Suppl 1:S1-84.

Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, Huang L, Beard CB, Kaplan JE. Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. Emerg Infect Dis. 2004; 10(10):1713-20.

Morris A, Wei K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. J Infect Dis. 2008; 197(1):10-7.

Nahimana A, Rabodonirina M, Bille J, Francioli P, Hauser PM. Mutations of *Pneumocystis jirovecii* dihydrofolate reductase associated with failure of prophylaxis. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(11):4301-5.

Nyamande K, Lalloo UG, York D, Naidoo M, Irusen EM, Chetty R. Low sensitivity of a nested polymerase chain reaction in oropharyngeal washings for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in HIV-infected patients. Chest. 2005; 128(1): 167-71.

O'Donnell WJ, Pieciak W, Chertow GM, Sanabria J, Lahive KC. Clearance of *Pneumocystis carinii* cysts in acute *P. carinii* pneumonia: assessment by serial sputum induction. Chest. 1998; 114(5):1264-8.

Olsson M, Elvin K, Löfdahl S, Linder E. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar samples by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993; 31(2):221-6.

Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. N Engl J Med. 1998; 338(13):853-60.

Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. Safe susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by flow cytometry with the fluorescent nucleic acid stain SYTO 16. [J Med Microbiol](#). 2005a;54(1):77-81.

Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG, Espinel-Ingroff A. Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometry. *J Clin Microbiol*. 2005b;43(9):4674-9.

Pina-Vaz C, Costa-Oliveira S, Rodrigues AG, Salvador A. [Novel method using a laser scanning cytometer for detection of mycobacteria in clinical samples](#). *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):906-8.

Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Mårdh PA. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *J Antimicrob Chemother* 2005c; 56(4):678-85.

Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Costa-Oliveira S, Tavares C, Martinez-de-Oliveira J. Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. *Clin Microbiol Infect*. 2001;7(11):609-18.

Pina-Vaz C, Sansonetty F, Rodrigues AG, Martinez-De-Oliveira J, Fonseca AF, Mårdh PA. Antifungal activity of ibuprofen alone and in combination with fluconazole against *Candida* species. *J Med Microbiol*. 2000a;49(9):831-40.

Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Sansonetty F, Martinez-De-Oliveira J, Fonseca AF, Mårdh PA. Antifungal activity of local anesthetics against *Candida* species. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2000b;8(3-4):124-37.

Pottratz ST, Paulsrud J, Smith JS, Martin WJ 2nd. *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by *Pneumocystis* gp120, a fibronectin binding protein. *J Clin Invest*. 1991; 88(2):403-7.

Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stirnger JR. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *J Eukaryot Microbiol*. 2006; 53(1):2-11.

Shah JS, Pieciak W, Liu J, Buharin A, Lane DJ. Diversity of host species and strains of *Pneumocystis carinii* is based on rRNA sequences. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1996; 3(1):119-27.

Souza W, Benchimol M. Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100(8):903-8.

Stringer JR. *Pneumocystis carinii*: what it is exactly? Clin Microbiol Rev. 1996; 9(4):489-98.

Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakafeld AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis. 2002; 8(9):891-6.

Stringer JR, Keely SP. Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. Infect Immun. 2001; 69(2):627-39.

Stringer SL, Stringer JR, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. Exp Parasitol. 1989; 68(4):450-61.

Thomas CF, Anders RA, Gustafson MP, Leof EB, Limper AH. *Pneumocystis carinii* contains a functional cell-division-cycle Cdc2 homologue. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998; 18(3):297-306.

Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia: clinical presentation and diagnosis in patients with and without acquired immune deficiency syndrome. Semin Respir Infect. 1998;13(4):289-95.

Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia. N Engl J Med. 2004; 350:2487-98.

Torres J, Goldman M, Wheat LJ, Tang X, Bartlett MS, Smith JW, Allen SD, Lee CH. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients with polymerase chain reaction: A blinded comparison to standard methods. Clin Infect Dis. 2000; 30(1):141-5.

Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, Cumsille F, Gigliotti F. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. Clin Infect Dis. 2001; 32(6):855-61.

Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, Ulloa AV, Prieto S, Muñoz MP, Hughes WT. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. J Clin Microbiol. 2000; 38(4):1536-8.

Vohra PK, Park JG, Sanyal B, Thomas CF Jr. Expression analysis of PCSTE3, a putative pheromone receptor from the lung pathogenic fungus *Pneumocystis carinii*. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 319(1):193-9.

Wannamethee SG, Sirivichayakul S, Phillips AN, Ubolyam S, Ruxrungtham K, Hanvanich M, Phanuphak P. Clinical and immunological features of human immunodeficiency virus infection in patients from Bangkok, Thailand. *Int J Epidemiol.* 1998; 27(2):289-95.

Wakefield AE. Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998; 22(1-2): 5-13.

Weinberg A, Duarte MI. Respiratory complications in Brazilian patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1993; 35(2):129-39.

Weverling GJ, Mocroft A, Ledergerber B, Kirk O, Gonzales-Lahoz J, d'Arminio Monforte A, Proenca R, Phillips AN, Lundgren JD, Reiss P. Discontinuation of *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis after start of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. EuroSIDA Study Group. *Lancet.* 1999; 353(9161):1293-8.

Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun.* 1992; 60(10):4140-5.